

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE QUERATINAS EPIDÉRMICAS A TRAVÉS DE
RATONES TRANSGÉNICOS**

Memoria de Investigación presentada por
Mirentxu Santos Lafuente para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Vº Bº del Director

José Luis Jorcano Noval

Este trabajo de investigación ha sido realizado en la Unidad de Biología Molecular y Celular del Instituto de Medio Ambiente del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección del Dr. José Luis Jorcano Noval.

A la memoria de

OSCAR;

*tu recuerdo y tu fuerza
siempre entre nosotros*

Esta página me brinda la oportunidad de poder expresar mi gratitud a todos aquellos que desde múltiples y diversos aspectos han prestado su colaboración para conseguir que este trabajo sea una realidad. Vaya desde aquí para todos mi más sincero agradecimiento.

Al CIEMAT, que puso los medios técnicos y humanos.

A José Luis, que me abrió las puertas del laboratorio donde se ha desarrollado este trabajo.

No puedo olvidar en este momento los miles de muestras que ha procesado de forma infatigable Pilar; sé que sin su ayuda nunca hubiera sido lo mismo. Además con ella he aprendido casi todo lo que pueda saber de fotografía en blanco y negro, buena parte de lo cual se asoma a las páginas de este trabajo.

A Ana, por lo mucho que de la patología que aquí se presenta tiene que ver con ella, por las esperanzas que abre cada vez que viene a visitarnos. Además tiene más mérito por todo el trabajo realizado cuando más difícil le resultaba.

A Angel, un buen maestro en la microinyección, por la dedicación prestada además de las sugerencias (las mejores) hechas durante la realización de los experimentos, y en la redacción del manuscrito.

Una mención especial en una memoria como la que aquí se presenta debe recaer en las personas encargadas del cuidado de los animales. Sé que pocos ratones han estado mejor cuidados que los utilizados en este trabajo gracias a los esfuerzos de Antonio, Eva, Rosa, y especialmente Jesús, cuya capacidad de realizar con buen humor las tareas más intempestivas del trabajo con los ratones nunca agradeceré lo suficiente.

Son muchas las personas a las que, dadas las dificultades presentadas por los ratones, hemos tenido que recurrir. Quisiera que de alguna forma su colaboración quedara plasmada en esta página: Claudio Ballestín y Rosa García, de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, colaboraron en el procesamiento de los tumores y los diagnosticaron, haciendo muy gratas mis visitas a su hospital; nuestros expertos en hematopoyesis (Florencio, Teresa, Guillermo, José Carlos, Israel); el departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM; Félix, por la colaboración prestada en la densitometría de las radiografías; Nicolás Bellido (UAM), C.Conti y J.C. Zencklussen (M.D. Anderson Center) por su ayuda con los tratamientos estadísticos; Montse, que realizó los mejores geles de proteínas que he visto; Paloma, Milagros y Marisa nuestras vecinas de Medicina, por su continua disposición a realizar los análisis que les pedíamos, casi siempre misiones imposibles; las consultas realizadas a expertos en medicina en sus distintas especialidades: Ernesto Moro (microscopía electrónica y patología), Luis Requena (dermatología), Alberto Rábano (neurobiología).

A todos los miembros de la Unidad, pasados, presentes y visitantes: Llanos, Rodolfo, Fernando, Cristina, Manuel y Jose, con los que he podido contar; Miguel Angel, Jesús, Elvira, Cristina C., Karmele, Carmen; Isabel, que siempre aporta jovialidad y energía; Claudia, que ha hecho más agradables los meses de este verano enseñándome lo que sé de embriología; Juan, José Carlos, Beatriz, Antonio, Guillermo, siempre tan positivo, Israel, Carmelo, M^a José, Ana, Mariló; Sole, que colaboró en la fotografía;

Pepe y sus chicos; Rosa, que realizó una valiosa aportación con sus comentarios, sugerencias y observaciones; Inma, Laura, María, Montse. Elena, Florencio y Teresa que tanto me han escuchado; Sergio, eficaz y dispuesto para todo lo que se le pide; Almudena, que me ha cedido tantas veces el ordenador..., a los miembros de la Oficina Técnica, por lo que con su trabajo facilitan el nuestro.

A las Dras. Carmen Rivas y Gemma Echezarreta, no sólo por la lectura del manuscrito, sino por lo que aprendí de, y con ellas, porque son el tipo de dedicación a la Ciencia que siempre me gustaría compartir. Al resto de mis compañeros de la Fundación Jiménez Díaz.

A mis amigos, por los años de amistad que venimos compartiendo, y los que nos quedan, por los buenos ratos, las cervezas, los viajes, las salidas al campo.....y muchas cosas más.

En último lugar (pero no el menos importante), debo agradecer cada minuto que he vivido y que vivo a todos los que de alguna forma han hecho de mí lo que soy, y han estado siempre cerca. No hay palabras para Carmen, Jesús, Trinidad, Oscar, Yolanda, Sonia, Estela, Héctor Javier, Arantxa, Cuco, el Barbas, Black, Omar y Jorge. Y por supuesto para Pedro, que en los últimos meses ha sabido muy bien lo que es la paciencia. GRACIAS A TODOS POR CRECER CON VOSOTROS.

INTRODUCCIÓN	1
1. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS.	1
2. ESTRUCTURA DE LAS QUERATINAS.	2
3. EPITELIOS: CARACTERÍSTICAS DE LA DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA, SU REGULACIÓN, PATRONES DE EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE QUERATINAS EN LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES EPITELIALES.	3
3.1 Epitelios: algunas características generales.	3
3.2 La diferenciación epidérmica; expresión específica de queratinas.	5
3.3 Regulación de la diferenciación epidérmica.	7
3.4 Regulación de la expresión de los genes de queratinas	8
3.5 K1/K10: el par característico de la diferenciación epidérmica.	10
4. FUNCIÓN DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS.	11
4.1 Análisis de la función de queratinas por animales transgénicos.	12
4.2 Patologías humanas causadas por mutaciones en genes de queratinas.	13
4.3 Función de otros FI	15
5. ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE QUERATINAS. EL PROCESO DE CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATÓN	16
5.1 El proceso de carcinogénesis de piel de ratón	16
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	22
1.1. Aislamiento de ADN plasmídico y purificación de fragmentos de restricción	22
1.2. Clonaje de plásmidos recombinantes	22
2. CÉLULAS EUCARIOTAS	24
2.1. Cultivo y conservación	24
2.2. Transfecciones transitorias	24
2.3. Cultivos primarios	25
3. GENERACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS	25
3.1. Preparación del ADN para microinyección	25
3.2. Obtención de ratones transgénicos	25
3.3. Obtención del ADN genómico	27
3.4. Identificación de ratones transgénicos mediante análisis de <i>Southern blot</i>	27
4. ANÁLISIS DE RATONES TRANSGÉNICOS	28
4.1. Obtención y tratamiento de las muestras	28
4.2. Análisis histológico	28
4.3. Análisis inmunohistoquímico	29
4.3.1. Inmunofluorescencias indirectas	29
4.3.2. Inmunoperoxidasas. Técnica de avidina-biotina	30
4.4. Análisis ultraestructural por microscopía electrónica.	31

4.5. Análisis de ARN por <i>Northern blot</i>	31
4.6. Extracción de FI y geles de proteínas	32
4.7. Análisis de la actividad mitótica	33
4.8. Tratamientos tópicos con AR y TPA	33
4.9. Protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. Análisis de los tumores	34
RESULTADOS	36
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE K1 Y K10 EN QUERATINOCITOS BASALES.	36
1.1. Construcciones génicas empleadas y su expresión en células en cultivo.	36
1.2. Generación e identificación de animales transgénicos. Caracterización de las líneas transgénicas.	38
1.2.1. Construcción bK5-hK10	38
1.2.2. Construcción bK5-hK1	41
1.3. Expresión de K10 en tejidos de animales bK5-hK10 adultos.	42
1.3.1. Expresión del transgén coincidente con mK5	43
1.3.2. Expresión genuinamente ectópica	47
1.3.3. Expresión proporcional al número de copias.	49
1.4. Efecto de la expresión de K10 en capas basales: alteraciones fenotípicas producidas en líneas de ratones transgénicos bK5-hK10	51
1.4.1. Ultraestructura	60
1.4.2. Análisis de la actividad mitótica	61
1.5. No se detecta expresión de K1 en ninguna de las líneas portadoras del transgén bK5-hK1.	63
1.6. Letalidad en los ratones bK5-hK10 y bK5-hK1. Análisis de embriones portadores del transgén bK5-hK10	63
2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE K1 Y K10 BAJO EL CONTROL DE bK6β.	66
2.1. Construcciones génicas empleadas y su expresión en células en cultivo.	66
2.2. Generación e identificación de animales transgénicos. Caracterización de las líneas transgénicas.	68
2.2.1. Construcción bK6β-hK10	68
2.2.2. Construcción bK6β-hK1	70
2.3. Expresión de K10 en animales transgénicos: localización de la proteína transgénica.	71
2.3.1. Expresión en animales adultos.	71
2.3.2. Expresión del transgén en la fundadora 1358	72
2.3.3. Expresión del transgén en recién nacidos de las líneas 1295 y 1358	74
2.4. Efecto de la expresión de hK10 bajo el control de bK6β.	76
2.4.1. Alteraciones fenotípicas producidas en las líneas 1295 y 1358	76
2.5. No se detecta expresión de K1 en ninguna de las líneas portadoras del transgén bK6β-hK1	80
2.6. Letalidad en los ratones bK6β-hK10 y bK6β-hK1. Análisis de embriones portadores del transgén bK6β-hK1.	81
2.7. Análisis de la expresión inducida del transgén bK6β-hK10.	83
3. CARCINOGENÉISIS DE PIEL DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN K10.	85
DISCUSIÓN	93

1.EXPRESIÓN DE LA QUERATINA K10, CARACTERÍSTICA DE ESTRATOS EPITELIALES DIFERENCIADOS POST-MITÓTICOS, EN CAPAS BASALES PROLIFERATIVAS	94
1.1. Posible papel de la queratina K10 en la diferenciación de epitelios estratificados	95
1.2. ¿Es realmente el fenotipo debido a la expresión del transgén?	97
1.3. Expresión genuinamente ectópica	100
2.EXPRESIÓN ECTÓPICA DE LA QUERATINA K10 EPIDÉRMICA BAJO EL CONTROL DE K6.	101
2.1. La expresión de la queratina 10 humana bajo el control de bK6 β produce alteraciones en diversos epitelios.	101
3. ¿SON LAS QUERATINAS INTERCAMBIABLES?	103
4.EXPRESIÓN FORZADA DE QUERATINA K10 EN CARCINOMAS EPITELIALES DE RATÓN.	103
5. AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE LA QUERATINA K1. POSIBLE EFECTO DELETÉREO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	105
CONCLUSIONES	108
BIBLIOGRAFIA	110

ABREVIATURAS:

Å: angström
AR: ácido retinoico
ARNm: ARN mensajero
BCIE: eritrodermia ictiosiforme ampollosa congénita
bK: queratina bovina
BMP: proteína morfogenética del hueso
BrdU: bromodeoxiuridina
cols.: colaboradores
d.p.c.: días *postcoitum*
DMBA: 7,12 -dimetil-benzantraceno
EBS: epidermólisis ampollosa simple
EBV: Virus de Epstein Barr
EDTA: ácido etilendiamintetraacético
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EPPK: queratoderma palmoplantar epidermolítico
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
FI: filamentos intermedios
fig: figura
GFAP: proteína ácida fibrilar de la glía
h: hora
hK: queratina humana
IBS: ictiosis ampollosa de Siemens
IL: interleuquina
K: queratina
Kb: kilobases
KDa: kilodalton
KGF: factor de crecimiento de queratinocitos
mK: queratina de ratón
NF: neurofilamento
nm: nanómetro
NT: no transgénico
rpm: revoluciones por minuto
pb: pares de bases
PC: paquioniquia congénita
pKi: punto isoeléctrico
TG: transgénico
TGF: factor de crecimiento transformante
TPA: 12-O-tetradecanato-13-acetato de forbol
VRE: vaina radicular externa

INTRODUCCIÓN

1. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS

El citoplasma de las células eucariotas incluye numerosos filamentos cuyo diámetro, comprendido entre 30 Å y 100 Å, depende de la naturaleza de las proteínas (globulares o fibrosas) que los componen. Algunos de estos filamentos constituyen un esqueleto endocelular.

La existencia de los Filamentos Intermedios (FI), se conoce desde hace casi un siglo, cuando por primera vez se observaron, en tinciones de plata de neuronas unas estructuras fibrilares del citoesqueleto (los neurofilamentos). Los primeros datos de la estructura de los FI se obtuvieron por difracción de rayos X de fibras de lana (Crick, 1953). Con el uso extendido de la microscopía electrónica, se conoció su ubicuidad en las células eucarióticas.

Los FI reciben este nombre por el tamaño de su diámetro (8-10 nm), que hace referencia al tamaño de diámetro intermedio entre los microfilamentos de actina (6nm) y los microtúbulos de tubulina (23nm). Microfilamentos, microtúbulos y FI forman los tres sistemas citoesqueléticos de las células eucariotas. De ellos el grupo constituido por los FI es el que presenta una mayor diversidad de proteínas, mayor especificidad de tipo celular y más complejos patrones de expresión. (Revisado en Steinert y Roop, 1988; Fuchs y Weber, 1994).

En la actualidad se conocen en humanos unas 50 proteínas de FI. Éstas se agrupan en cinco tipos principales, basándose en la homología de secuencia y de estructura génica. Existen dos proteínas (nestina y filensina) de la familia de los FI, que, por el momento se consideran aparte de los cinco grupos :

-Tipo I: son las **queratinas** ácidas; queratinas epiteliales 9 a 20 del catálogo de Moll (Moll, 1982) y queratinas de pelo Ha1 a Ha4 (Heid 1986; 1988; revisado en Rogers y Powell, 1993). Su peso molecular oscila entre 40-62 kDa y su punto isoeléctrico pKi entre 4 y 6.

-Tipo II: son las **queratinas** neutro-básicas (pKi entre 6 y 8), comprende las queratinas epiteliales 1 a 8, y queratinas de pelo Hb1-Hb4. Su peso molecular oscila entre 53-67 kDa.

Las queratinas son los FI característicos de las células epiteliales, se caracterizan por ser heteropolímeros obligados, lo que implica que, para la formación de filamentos se requieren cantidades equimolares de una combinación de una queratina de tipo I con una de tipo II.

-Tipo III: formada por la **vimentina**, (53 kDa), se expresa principalmente en células de origen mesenquimal (endotelio vascular, células sanguíneas, fibroblastos); la **desmina**, (52 kDa), su expresión queda restringida a las células del músculo esquelético y cardíaco, donde se concentra en las bandas Z; la **proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP)**, (51 kDa) de expresión limitada a astrocitos y células de glía del sistema nervioso central; y la **periferina**, localizada en determinadas poblaciones de neuronas del sistema nervioso periférico, (con tres isoformas de 56, 58 y 61 kDa).

-Tipo IV: constituido por los **neurofilamentos** y la **α -internexina**. Los neurofilamentos (NFs) están compuestos por tres proteínas: NF-L (68 kDa), NF-M (160 kDa) y NF-H (200kDa) que se expresan en neuronas en diferentes momentos del desarrollo: la expresión de NF-L y NF-M comienza en el feto, mientras que no se detecta expresión de NF-H hasta el período postnatal.

La α -internexina recibe su nombre de su capacidad para asociarse *in vitro* con otros FI (vimentina, GFAP, NF-L). Esta proteína, de 66 kDa, se expresa de forma específica en neuronas.

-Tipo V: son las **laminas**, proteínas que forman un entramado fibroso, la lámina nuclear, en la superficie interna de la membrana nuclear. De 60-80 kDa, se clasifican en dos tipos: laminas A (ácidas), y laminas B (neutras). Las laminas B se expresan en todos los tipos celulares, sin embargo, no se encuentran laminas A en embriones tempranos de vertebrados.

-En último lugar, se han descubierto recientemente proteínas que, en base a su estructura y secuencia, forman parte de la familia de los FI, sin embargo no quedan clasificadas dentro de algunos de los grupos anteriores: éstas son la **nestina** (240 KDa), que se expresa en las células madre (*stem*) del sistema nervioso central y músculo esquelético durante el desarrollo (Lendahl y cols., 1990) , y la **filensina** (54 kDa) de las células epiteliales de la diferenciación del cristalino (Gounari y cols., 1993).

2. ESTRUCTURA DE LAS QUERATINAS

Como todas las cadenas proteicas de FI, las queratinas presentan un dominio central helicoidal α -hélice o "rod", constituido en el caso de las queratinas por aproximadamente 310 aminoácidos, de secuencia y estructura secundaria muy conservada, interrumpido por tres segmentos cortos no helicoidales. Los extremos de estos dominios centrales constituyen las zonas más conservadas, y en ellos se han detectado mutaciones (por sustituciones de aminoácidos, o deleciones) que producen graves perturbaciones funcionales y estructurales

en las células. El dominio central generalmente está flanqueado por dominios terminales no helicoidales, los extremos amino y carboxi-terminal, que se ordenan según patrones característicos que permiten su clasificación en subdominios (H, V y E) en función de su grado de homología, repeticiones de péptidos o carga. Estos extremos son variables tanto en secuencia como en longitud, siendo los responsables de las diferencias de peso molecular en las distintas queratinas.

Los polipéptidos de queratinas se ensamblan formando inicialmente dímeros constituidos por una molécula de queratina de tipo I y otra de tipo II; estos dímeros se asocian de forma antiparalela y forman tetrámeros; los tetrámeros se asocian entre sí para formar los filamentos, estructuras muy complejas que configuran proteínas muy estables. La formación de filamentos se realiza en ausencia de factores proteicos auxiliares (Steinert y cols., 1976). Para una revisión ver Steinert y Roop, 1988; Steinert, 1993; Fuchs y Weber, 1994; Steinert y cols., 1994.

3. EPITELIOS: CARACTERÍSTICAS DE LA DIFERENCIACIÓN EPIDÉRMICA, SU REGULACIÓN, PATRONES DE EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE QUERATINAS EN LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES EPITELIALES

3.1 Epitelios: algunas características generales

Las células epiteliales cubren como epitelios de revestimiento todas las superficies internas y externas de los animales. Dada esta localización, sufren la pérdida continua de las células más superficiales, de ahí que se renueven constantemente. Los epitelios proporcionan un recubrimiento protector flexible, por lo que las células que los constituyen presentan una gran cohesión gracias a la existencia de uniones celulares especializadas (desmosomas) (Cowin y cols., 1985). Estos tejidos se especializan en funciones diversas como secreción, absorción, excreción, transporte, o recepción sensorial. Llegan a diferenciarse hasta producir apéndices cutáneos como pelos, plumas, uñas y cuernas.

Los tejidos epiteliales se caracterizan morfológicamente según la forma de las células y según el tipo de estratificación. Se subdividen en diferentes tipos en función del número de capas celulares que los constituyen (simples o estratificados, si las células epiteliales se disponen en una o varias capas respectivamente), o la forma de sus células (pavimentosos, cúbicos o prismáticos). Los epitelios estratificados pueden ser queratinizados, si presentan células muertas ricas en queratina (piel), o no queratinizados (lengua, esófago, córnea) (Poirier, 1978; Bloom y Fawcett, 1981; Stenn y cols., 1992).

Una de las funciones que desempeñan los epitelios consiste en proporcionar una cobertura flexible aunque resistente, al organismo. Parte de la flexibilidad necesaria en los epitelios de revestimiento viene proporcionada gracias a la existencia de un complejo citoesqueleto de FI de queratinas en el citoplasma celular. Estos FI de queratinas son estructuras muy dinámicas, continuamente intercambiando proteínas a lo largo del filamento en respuesta a las diferentes fases del ciclo celular, movimiento de células en la epidermis y diferenciación epitelial (Steinert y Liem, 1990).

La epidermis es un tipo de epitelio estratificado que se estructura en varias capas (representadas en la figura 1): el estrato germinativo o basal, en contacto con la membrana basal, es el único con capacidad proliferativa, los estratos espinoso y granuloso forman las capas suprabasales de células vivas y el estrato córneo, formado por células muertas de aspecto escamoso en la superficie externa expuesta. En áreas proliferativas como la planta del pie y la palma de la mano se distingue además el estrato lúcido, que se interpone entre las capas granulosa y córnea, formado por células sin núcleo, eosinófilas, aplanadas y densamente apretadas.

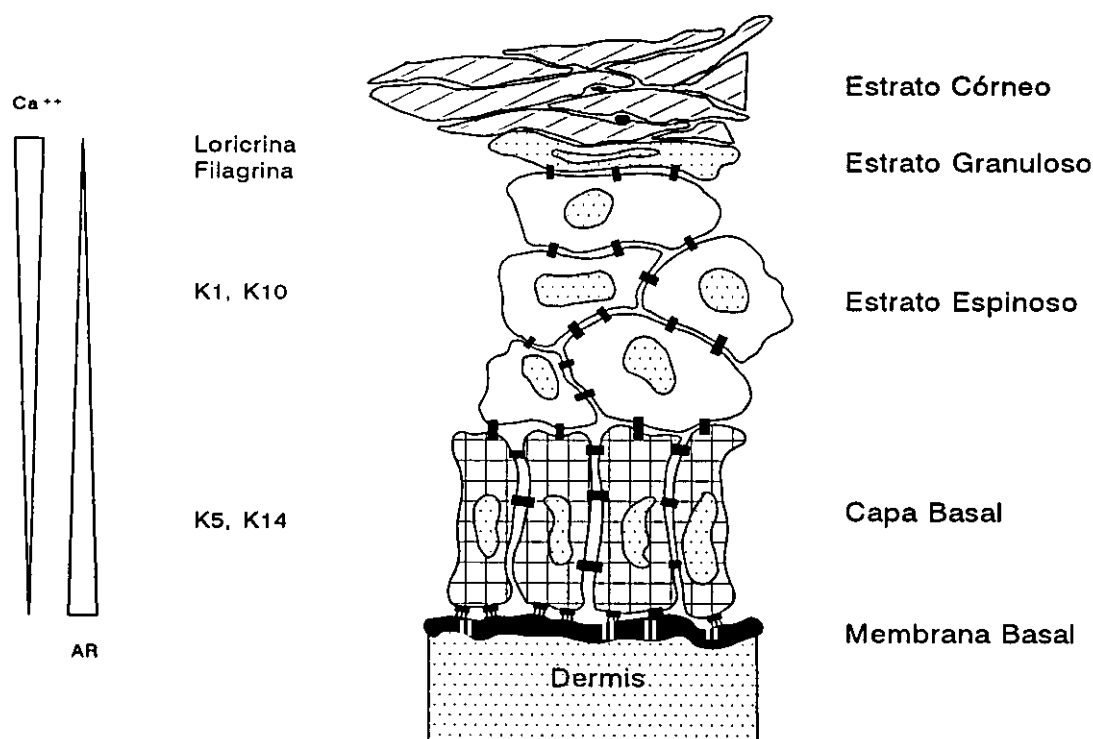


Figura 1. Esquema de un epitelio estratificado. Se representan los gradientes, los marcadores y los estratos representativos.

3.2 La diferenciación epidérmica; expresión específica de queratinas

El proceso de diferenciación epidérmica es un proceso altamente coordinado y regulado de cambios graduales asociados a la evolución que sufren las células basales proliferativas hasta convertirse en las células muertas del estrato córneo: la diferenciación terminal comienza con la migración de células de las capas basales al compartimiento suprabasal, continúa con la progresión de células a través de los estratos espinoso y granuloso, y termina con la deposición de escamas en el estrato córneo, que van siendo reemplazadas por las sucesivas capas celulares en continuo proceso de diferenciación. Este proceso dura aproximadamente tres semanas en la epidermis humana y va acompañado de profundos cambios en la expresión genética, siendo las queratinas las proteínas cuya expresión diferencial mejor se conoce.

La epidermis dedica una gran parte de su capacidad de síntesis proteica a la síntesis de queratinas (> 80% del contenido proteico en las células diferenciadas). Las células basales de epidermis expresan de forma mayoritaria las queratinas K5 y K14 (Fuchs y Green 1980; Nelson y Sun 1983; Byrne y Fuchs 1994). Uno de los primeros cambios asociados al proceso de diferenciación y migración al estrato espinoso, es la inducción de las queratinas K1 y K10, que reemplazan a K5 y K14, y constituyen las proteínas mayoritarias de las capas suprabasales de epidermis en la mayoría de las localizaciones epidérmicas (Fuchs y Green 1980; Roop y cols., 1987; Schweizer y cols., 1988; Stellmach y cols., 1991). En la fase terminal de maduración, en el estrato granuloso comienza la síntesis de proteínas no filamentosas: loricrina y filagrina, componentes esenciales en esta localización (Mehrel y cols., 1990; Steven y cols., 1990); la filagrina se asocia con las queratinas para formar los característicos gránulos de queratohialina. Estas proteínas, tras ser modificadas por la transglutaminasa epidérmica, forman una envuelta cornificada altamente resistente e insoluble característica del estrato córneo (Rice y Green, 1977).

Como se ha mencionado, las queratinas son heteropolímeros obligados: la mayoría de los tipos celulares epiteliales expresan un tipo particular de queratina del tipo I que se asocia de forma específica con otra queratina del tipo II (Eichner y cols., 1986), representados en la figura 2; se habla así de "pares de queratinas" en referencia a las parejas de queratinas que son coexpresadas en diferentes rutas de diferenciación epitelial (Sun y cols., 1984). Así, K5 y K14 forman un par característico de células basales, estas células expresan también K15 (Leube y cols., 1988; Lloyd y cols., 1995). El par K1/K10 se expresa en capas suprabasales de epitelios estratificados queratinizados junto a menores cantidades de K2e, K2p (Collin y cols., 1992), K11 (Moll y cols., 1982), y K9 en determinadas localizaciones como epidermis plantar y palmar (Schweizer y cols., 1989, Langbein y cols., 1993).

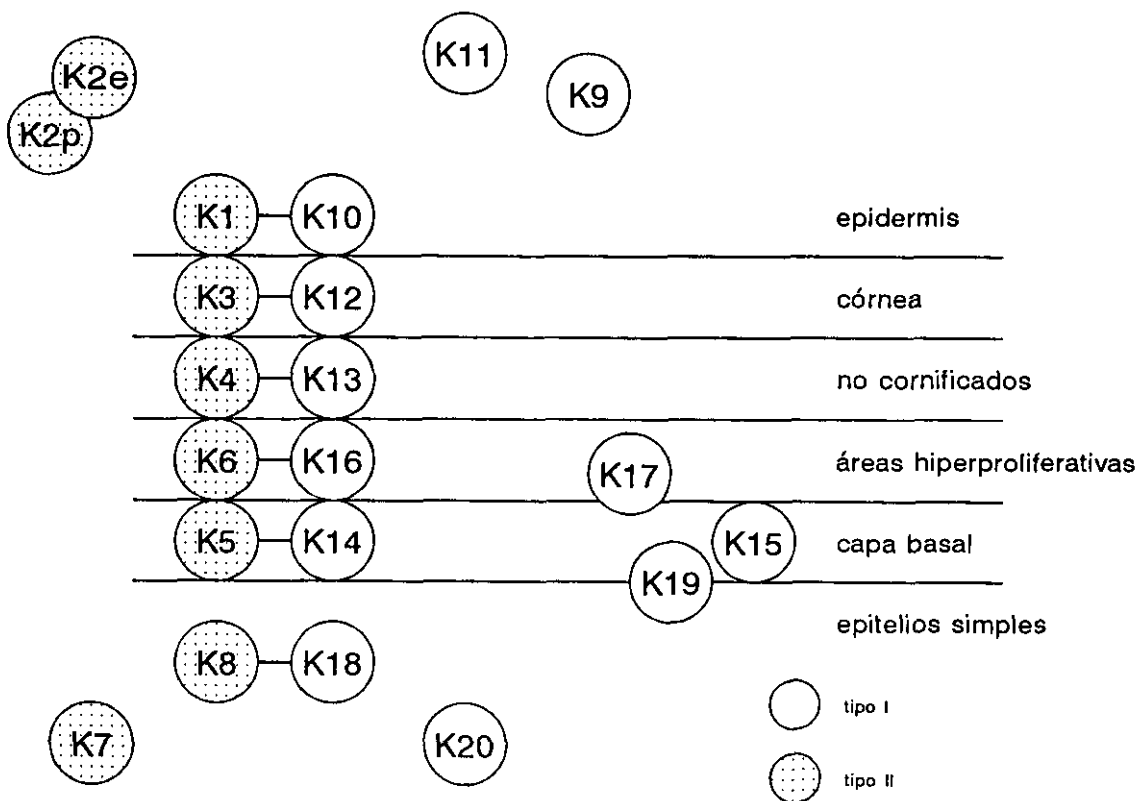


Figura 2. Resumen de los principales pares de queratinas expresados en los distintos tipos de epitelios. Los números hacen referencia a la clasificación de las queratinas humanas (Moll y cols., 1982).

K1/K10 son las proteínas mayoritarias en las capas diferenciadas de epidermis, donde su transcripción se ciñe al estrato espinoso, aunque también está presente en células suprabasales de otros epitelios, tales como el tracto genital o estómago aglandular del ratón; sin embargo en epitelios estratificados no queratinizados de órganos internos como esófago o lengua, K4/K13 constituye el par mayoritario característico de diferenciación (Grace y cols., 1985; Rentrop y cols., 1986; Van Muijen y cols., 1986). En el epitelio de córnea K3/K12 son los componentes principales de las capas suprabasales (Schermer y cols., 1986; 1989; Wu y cols., 1994).

El par K8/K18 se expresa en el embrión temprano, y es específico de epitelios simples, junto con el par K7/K19 que aparecen en glándulas de origen epitelial (Franke y cols., 1981; Moll y cols., 1982; Oshima y cols., 1983).

K6 y K16 se expresan de forma natural en algunos epitelios estratificados como lengua, paladar, esófago, exocérnix, glándulas sebáceas, en la vaina radicular externa (VRE) de folículos pilosos, también en áreas de la piel sometidas a hiperproliferación como la planta del pie (Moll y cols., 1982; Quinlan y cols., 1985; Rentrop y cols., 1986; Stark y cols., 1987); y se inducen en la capa suprabasal de epidermis interfolicular en estado de hiperproliferación como consecuencia de diversos estímulos que alteran la biología normal del queratinocito: procesos de cicatrización de heridas (Mansbridge y Knapp 1987), tratamientos con ácido retinoico (AR) o ésteres de forbol (Schweizer y Winter, 1982; Schweizer y cols., 1987; Stellmach y Fuchs, 1989), expresión del factor de crecimiento transformante α (TGF α) (Vassar y Fuchs, 1991; Dominey y cols., 1993), TGF β (Sellheyer y cols., 1993), factor de crecimiento epidérmico (EGF), (Jiang y cols., 1993), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), (Guo y cols., 1993), BNLF-1, la proteína latente de membrana del virus de Epstein-Barr (Wilson y cols., 1990), formas mutadas de hK14 (Vassar y cols., 1991), hK10 (Fuchs y cols., 1992), v-ras^{Ha} (Greenhalgh y cols., 1993 a), fos (Greenhalgh y cols., 1993 b), expresión de un mutante del receptor de AR (Imakado y cols., 1995).

K17 tiene un patrón de expresión característico, similar a K16, pero no idéntico; se expresa de forma transitoria en capas basales de epitelios estratificados durante el desarrollo, en folículos pilosos, se induce junto con K6 y K16, y se localiza en determinados tumores, además es una proteína abundante en células basales de epitelios complejos, glándulas y epitelios de transición (Trojanovsky y cols., 1992).

K20 se expresa de forma específica en células de la mucosa intestinal y gástrica, incluyendo tumores y líneas celulares que de ellos se derivan. El patrón durante el desarrollo embrionario es muy similar al de adultos (Moll y cols., 1993)

La organización en el genoma de los genes de queratinas es similar a la de otras familias de genes, que se ordenan ligados en grupos. Este agrupamiento no parece estar relacionado con la expresión tan específica que hemos visto, sino que probablemente sea el resultado de numerosas duplicaciones ocurridas a lo largo de la evolución. En humanos, la mayoría de los genes de las queratinas de tipo I se localizan en el cromosoma 17, mientras que en el cromosoma 12 se encuentran la mayoría de los genes de las de tipo II. En el mismo cromosoma se localizan también pseudogenes que no se transcriben (Rosenberg y cols., 1988; Romano y cols., 1988; Savtchenko y cols., 1990, Waasem y cols., 1990 a y b).

3.3 Regulación de la diferenciación epidérmica

La regulación del crecimiento y la diferenciación epidérmica es un proceso complejo que implica tanto factores que se producen localmente como factores circulantes que actúan

de forma paracrina (revisado en Fuchs, 1990): EGF, TGF α , KGF, FGF, bajas concentraciones de retinoides, las interleuquinas IL-1 α e IL-6, estimulan el crecimiento de queratinocitos; TGF- β está relacionado con el control de la proliferación de células basales, la proteína BMP-6 parece inhibir el crecimiento celular previo a la diferenciación (Drozdoff y cols., 1994); la actividad de la fosfolipasa C aumenta durante la maduración hacia el estrato córneo (Punnonen y cols., 1993), determinadas isoformas de proteína-quinasa C están implicadas en la fase terminal de maduración de los queratinocitos (Dlugosz y Yuspa, 1993); la integrina $\alpha 6 \beta 4$ media en la interacción de las células basales con la membrana basal, habiéndose recientemente puesto de manifiesto un importante papel en la señalización celular (Mainiero y cols., 1995), otras integrinas mantienen la estratificación por interacciones célula-célula (Hertle y cols., 1991); un cambio en la expresión de las conexinas seguido de una modificación selectiva de la permeabilidad de membrana altera el control del proceso coordinado de diferenciación (Brissette y cols., 1994). Se han descrito otro tipo de factores capaces de inducir la diferenciación en medios de cultivo, como la densidad celular (Poumay y Pittelkow, 1995).

Varios estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* consideran al calcio como el principal modulador de la diferenciación epidérmica. En la epidermis, se ha identificado un gradiente de calcio con los niveles más bajos en las capas basales, y crecientes a medida que se avanza hacia el estrato córneo (Menon y cols., 1985). Por el contrario, el ácido retinoico parece reprimir la diferenciación; en la epidermis el gradiente de AR presenta los niveles más altos en la capa basal, disminuyendo progresivamente hacia el estrato córneo (Roop y cols., 1989). Alteraciones en la función de los receptores del AR conducen a defectos en la formación de la envuelta cornificada y en la función de barrera de la piel (Imakado y cols., 1995). La vitamina D₃ es también un regulador de la diferenciación; se conoce su capacidad de inhibir la proliferación y de promover la diferenciación de las células de los estratos espinoso y granuloso hacia el estrato córneo (Regnier y Darmon 1991).

El proceso de diferenciación epitelial es considerado por algunos autores un proceso de apoptosis (McCall y Cohen, 1991); este argumento viene apoyado por el hecho de que las células epiteliales desprovistas de sujeción al sustrato sufren un proceso de apoptosis que se inhibe con la expresión de bcl-2 (Frisch y Francis, 1994), un conocido regulador de la muerte celular programada (Hockenberry y cols., 1990). Si los niveles de bcl-2 se minimizan con la expresión de vectores virales antisentido, los queratinocitos epidérmicos aceleran el proceso de diferenciación y aumentan la apoptosis (Marthinuss y cols., 1995).

3.4 Regulación de la expresión de los genes de queratinas

La expresión específica tan refinada de tejido, de tipo celular, de diferenciación epitelial y de estado del desarrollo, así como la necesidad de expresión de queratinas en

pares de tipo I y II, sugiere que tengan un complejo mecanismo de regulación.

La regulación de la expresión de los genes de queratinas tiene lugar principalmente a nivel de la transcripción (Jorcano y cols., 1984; Oshima y cols., 1988; Lersch y cols., 1989; Stellmach y cols., 1991), aunque se han descrito modificaciones post-transcripcionales (Roop y cols., 1988; Steinert, 1988) y casos de regulación a nivel de la traducción (Tyner y Fuchs, 1986).

La identificación de elementos reguladores se ha realizado mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*; no siendo siempre coincidentes los resultados obtenidos por ambas aproximaciones (Kulesh y Oshima, 1988; Vassar y cols., 1989; Navarro, 1992; Ramírez, 1993; Casatorres y cols., 1994; Ramírez y cols., 1994; Navarro y cols., 1995; Ramírez y cols., 1995).

Los estudios *in vitro* han identificado secuencias específicas capaces de conferir actividad transcripcional y secuencias de unión a proteínas nucleares importantes en la regulación de varios genes de queratinas: bK6 β (Blessing y cols., 1989; Navarro, 1992; Navarro y cols., 1995), hK18 (Oshima y cols., 1990), hK14 (Jiang y cols., 1990; Leask y cols., 1990), mK8 (Takemoto y cols.), hK1 (Leask y cols., 1991; Huff y cols., 1993; Lu y cols., 1994), la queratina K3 de conejo (Wu y cols., 1993), hK5 (Byrne y Fuchs, 1993), bK5 (Casatorres, 1993; Casatorres y cols., 1994) y queratinas de lana (Powell y cols., 1992).

Por otro lado, los estudios *in vivo* han identificado zonas reguladoras capaces de dirigir correctamente la expresión en ratones transgénicos: es el caso de hK14 (Vassar y cols., 1989), hK19 (Bader y Franke, 1990), hK18 (Abe y Oshima, 1990), bK10 (Bailleul y cols., 1990), hK1 (Rosenthal y cols., 1991), hK5 (Byrne y Fuchs, 1993), hK8 (Casanova, 1994; Casanova y cols., 1995), queratinas de pelo (Powell y Rogers, 1990; Mc Nab y cols., 1990), y la identificación de los promotores de bK5 y bK6 β capaces de dirigir expresión específica de tejido y durante el desarrollo, de forma correcta a epidermis de ratones transgénicos (Ramírez, 1993; Ramírez y cols., 1994; 1995), fundamentales en este estudio, ya que nos hemos valido de la información que nos han proporcionado para elaborar nuestro modelo animal: expresar de forma ectópica las queratinas hK1 y hK10 dirigidas por ellos, y evaluar los efectos. Las secuencias reguladoras de bK5, dirigen expresión a capas basales de epitelios estratificados con especificidad de tejido, de tipo celular y durante el desarrollo embrionario, cuya síntesis a partir del día 13.5 de gestación se detecta en los primordios de la mayoría de órganos y epitelios en los que tendrá una posterior expresión en adultos. Para bK6 β , las secuencias reguladoras dirigen la expresión génica a las localizaciones que reproducen con fidelidad el complejo patrón de expresión de la queratina K6, en sus aspectos constitutivo e inducible. Durante el desarrollo embrionario, su expresión comienza a partir

del día 13.5 de gestación en los epitelios de la zona oral del embrión.

3.5 K1/K10: el par característico de la diferenciación epidérmica

Desde el punto de vista estructural, las queratinas K1 y K10 tienen grandes dominios amino y carboxi-terminales, ricos en glicina y serina; secuencias que no se encuentran en las queratinas de epitelios simples, ni en la mayoría de las otras queratinas (Jorcano y cols., 1984; Steinert y cols., 1985; Zhou y cols., 1988). Como se ha mencionado, se sintetizan en las capas suprabasales (postmitóticas) de epidermis y se han de integrar en un citoesqueleto preexistente de queratinas K5 y K14. *In vitro* se ha descrito un efecto similar: los genes de K1 y K10 transfectados en fibroblastos son incapaces de formar una red de FI; necesitan una red de FI de células basales previa, que expresen K5 y K14. Además, en las transfecciones, K10 forma agregados de aspecto redondeado en el citoplasma (Kartasova y cols., 1993; Paramio y Jorcano, 1994). Sin embargo, en contraposición a estos datos, estudios *in vivo* denotan la capacidad de K1 y K10 de formar redes de filamentos en un paciente que carece de la queratina K14 (Chan y cols., 1994), y en ratones con el gen de K14 inactivado por recombinación homóloga (Lloyd y cols., 1995).

Se conocen dos alelos para cada uno de los genes de K1 y K10, que se diferencian entre sí por una delección en los dominios carboxi-terminales ricos en glicina, y constituyen importantes marcadores polimórficos en los cromosomas 12 y 17 de humanos respectivamente (Korge y cols., 1992 a; Korge y cols., 1992 b).

La expresión de K1 antecede a la de K10, y es uno de los primeros eventos de la diferenciación epidérmica. Es posible observar K1 de forma ocasional en células basales que están a punto de migrar a las capas superiores de epidermis (Huitfield y cols., 1991). La expresión del ARNm de estas queratinas está estrechamente regulada y restringida al estrato espinoso de la epidermis. En el estrato granuloso, estas queratinas se asocian con la filagrina, que las agrega en los gránulos de queratohialina, que son los que dan la apariencia característica, y el nombre a este estrato. Posteriormente sufren fuertes modificaciones en el estrato córneo.

El conocimiento de los factores de transcripción que regulan genes específicos de la diferenciación epidérmica es bastante limitado, siendo el gen de K1 el mejor estudiado: se han identificado los elementos de control que median en la expresión específica de la diferenciación (Huff y cols., 1993); se ha identificado un elemento de respuesta al calcio en un fragmento de 249 pb situado a 7.9 Kb del inicio de la transcripción (Rothnagel y cols., 1993), un factor AP-1 en la zona 5', que media en la respuesta al calcio, y un elemento de respuesta a hormonas esteroideas que modula la respuesta al calcio vía AR y vitamina D₃ (Lu y cols., 1994). Estos datos sugieren que la transcripción del gen de hK1, al igual que se ha

descrito para otras queratinas (Leask y cols., 1990), necesita de elementos tanto proximales como distales al promotor, y que el elemento de respuesta al calcio situado en 3' (3'-CaRE) tiene una importancia funcional en la transcripción de este gen. Se ha utilizado un fragmento de 10.8 Kb con 1.2 y 3.3 Kb de elementos flanqueantes al gen en 5' y 3' respectivamente, del gen de K1 para dirigir su expresión a epidermis de ratones transgénicos (Rosenthal y cols., 1991; Chung y cols., 1994).

Durante el desarrollo embrionario, la inducción de K1 y K10 es posterior a la de K5 y K14, y se detecta la expresión de ambos genes en el momento en que la epidermis diferencia, destacándose un gran paralelismo entre la epidermis adulta y la embrionaria (Byrne y cols., 1994). No todos los autores coinciden en el momento más temprano de detección de expresión de K1 y K10 en el embrión: Ouellet y cols., (1990) detectan ARNm de K1 en el día 10 del desarrollo embrionario de ratón, mientras que no detectan ARNm de K10 antes del día 12, sugiriendo una regulación independiente en el desarrollo; Byrne y cols. (1994) detectan la expresión de K1 y K10 mediante hibridaciones *in situ* en el día 13.5 a medida que las células epidérmicas diferencian en estratos granuloso y espinoso. Las proteínas de ambos genes se visualizan en inmunoblot a partir del día 15, según una secuencia temporal de cambios morfológicos críticos en la formación de una barrera epidérmica funcional durante el desarrollo (Bickenbach y cols., 1995).

4. FUNCIÓN DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS

El desarrollo, diferenciación, expresión específica de tejido y tipo celular de las queratinas y el resto de los FI, su ubicuidad en las células eucariotas, la amplia conservación de secuencias y estructura entre distintas especies, sugiere una importante función para estas proteínas en las células y tejidos. Durante mucho tiempo se ha pensado que desempeñan un papel en la integridad mecánica de las células. Sin embargo, el conocimiento que se tiene de este aspecto de las queratinas y del resto de los FI es todavía relativamente limitado, habiéndose producido recientemente los avances más interesantes. Se comienza a tener evidencia de que las proteínas de la familia de los FI desempeñan papeles importantes en procesos tales como gastrulación, embriogénesis, organización nuclear, replicación del ADN, resistencia mecánica, ensamblaje de la envoltura nuclear, y regulación del calibre axonal.

Los datos aportados por los experimentos realizados con cultivos celulares no han supuesto una gran contribución para dilucidar el papel de los FI, en parte debido a que las células en cultivo soportan bastante bien alteraciones en su citoesqueleto (Franke y cols., 1984; Giudice y Fuchs, 1987; Paulin-Levasseur y cols., 1988). Estudios realizados utilizando células transfectadas con varios clones de genes de queratinas, o induciendo su expresión por tratamientos con drogas, han mostrado que la expresión ectópica de queratinas en células

epiteliales (y también no epiteliales) no es capaz de alterar la morfología o la supervivencia celular (Albers y Fuchs 1987, 1989; Doumenjoud y cols., 1988,; Kulesh y Oshima, 1988; Lersch y cols., 1989; Blessing y cols., 1989; Lu y Lane, 1990; Bader y cols., 1991; Albers y cols., 1995); dada la existencia de datos contradictorios obtenidos según aproximación experimental, sugiere que la función de los FI debe demostrarse a nivel de tejido, órgano, o dentro del contexto de un organismo completo, por lo que los avances en este campo, han venido de la mano de la tecnología del uso de células embrionarias totipotentes (células ES, iniciales del inglés "Embryonic Stem"), de animales transgénicos, y del análisis de mutaciones en los genes de queratinas causantes de ciertas patologías humanas.

4.1 Análisis de la función de queratinas por animales transgénicos

Experimentos realizados con embriones de *Xenopus leavis* sugieren un importante papel para las queratinas en la embriogénesis, ya que la inyección de oligonucleótidos antisentido inhibe la gastrulación (Torpey y cols., 1992), o el uso de anticuerpos específicos produce defectos en este estadio del desarrollo embrionario (Klymkovsky y cols., 1992).

Como se mencionó anteriormente, las queratinas K8 y K18 son los primeros FI que aparecen durante la embriogénesis, encontrándose tanto en el endodermo como en el ectodermo embrionario, por lo que se ha pensado que estas proteínas podrían estar jugando un papel en estos momentos críticos de la embriogénesis. Baribault y Oshima (1991), demuestran que la inactivación de los dos alelos de mK8 por recombinación homóloga, no impide la formación de un endodermo extraembrionario en cuerpos embrionarios desarrollados *in vitro*. Sin embargo, esta misma inactivación en ratones transgénicos tiene como resultado la letalidad embrionaria en una proporción de los mutantes homocigotos (Baribault y cols., 1993), proporción que varía dependiendo del fondo genético de los animales usados. Los ratones de la cepa FVB/N deficientes para este gen desarrollan hiperplasia colorectal (Baribault y cols., 1994), presentando un aumento anómalo en el número de células epiteliales en el intestino grueso. Este fenotipo contrasta con el rompimiento celular que se observa en los ratones que expresan la mutación dominante negativa del gen de K14 (Vassar y cols 1991; ver más adelante), sugiriendo para las queratinas de epitelio simple una función adicional a la meramente estructural.

En otros experimentos, la información obtenida de la sobreexpresión o expresión ectópica de genes de queratinas ha contribuido a dilucidar su función. Enumeramos aquí algunos de ellos:

- la sobreexpresión de la queratina 8 humana tiene efectos fisiopatológicos; los ratones transgénicos que integran un alto número de copias del transgén, y por tanto expresan elevadas cantidades de proteína humana, presentan un fenotipo de pequeño tamaño y pelo

erizado, alteraciones en la hipófisis y disfunción pancreática (Casanova, 1994; Casanova y cols., 1995).

- expresión ectópica de la queratina hK1 (pero no hK10) en las células β de páncreas conduce a una forma especial de diabetes. En estos ratones hK10 se aloja en las células pancreáticas y es compatible con la función celular, mientras que los ratones que expresan hK1 sólo o en combinación con hK10 desarrollan una forma de diabetes caracterizada por una drástica reducción de las células productoras de insulina (Blessing y cols., 1993).

- la sobreexpresión de hK16 en ratones transgénicos tiene como consecuencia la queratinización aberrante de la VRE y epidermis proximal, así como hiperproliferación, acantosis e hiperqueratosis de la epidermis interfolicular (Takahashi y cols., 1994).

- Albers y colaboradores utilizan un modelo animal de ratones transgénicos, en el que la expresión ectópica de la queratina epidérmica hK14 en hepatocitos provoca una alteración de la red de filamentos endógenos de K8/K18, y conduce a anomalías histopatológicas y funcionales en el hígado (Albers y cols., 1995).

- la sobreexpresión de una queratina de tipo II de pelo en los folículos pilosos produce cambios en la estructura del pelo, pelo frágil y quebradizo y ciclos de caída y nuevo crecimiento (Powell y Rogers 1990). En este caso la expresión de una queratina de tipo II, en gran exceso en relación a su pareja de tipo I, produce una agregación de proteína que interfiere con la organización normal de los FI.

- la expresión de formas mutadas de hK14 y hK10, que impiden la formación del citoesqueleto de FI, en las regiones basal y suprabasal, respectivamente, de la piel de ratones transgénicos conduce a fragilidad celular y rotura de la epidermis a nivel del estrato afectado. Este fenotipo es muy similar al de pacientes que sufren mutaciones en estas queratinas (ver más adelante) (Coulombe y cols., 1991b; Vassar y cols., 1991; Fuchs y cols., 1992). En función de estos últimos resultados se ha sugerido que en epidermis, y probablemente en el resto de los epitelios, la función de las queratinas podría ser conferir resistencia a las células e integridad mecánica al tejido. Admitido esto, sin embargo, otros experimentos tales como los ratones transgénicos que tienen inactivado el gen de K8 o sobreexpresando K16 en piel, sugieren que las queratinas podrían estar implicadas en procesos relacionados con la proliferación y diferenciación celulares y que, por lo tanto, trascienden la mera resistencia mecánica.

4.2 Patologías humanas causadas por mutaciones en genes de queratinas

Este es un campo en el que han tenido lugar los avances más espectaculares en los

últimos años. La función de las queratinas permanecía sin demostrar fehacientemente hasta los recientes descubrimientos de mutaciones en genes de queratinas que conducen a enfermedades caracterizadas por fragilidad epidérmica. La integridad de la piel se altera por sustituciones de un único aminoácido en las moléculas de queratinas (revisado en Steinert y Bale 1993; Fuchs 1994; Fuchs y cols., 1994).

Hasta el momento se han identificado mutaciones en varios genes diferentes de queratinas causantes de enfermedades genéticas de la piel: las mutaciones en los genes de K5 y K14 son causantes de epidermólisis ampollosa simple (EBS) caracterizada por la formación de ampollas seguida de la ruptura de las células basales en respuesta a una agresión física suave (Bonifas y cols., 1991; Coulombe y cols., 1991 b; Lane y cols., 1992). De forma parecida, en la eritrodermia ictiosiforme ampollosa congénita (BCIE) mutaciones en las queratinas K1 y K10 producen citolisis suprabasal e hiperqueratosis epidermolítica (Cheng y cols., 1992; Chipev y cols., 1992; Rothnagel y cols., 1992); mutaciones en el gen de la queratina K9 son responsables de la queratoderma palmoplantar epidermolítica (EPPK) (Reis y cols., 1994; Torchard y cols., 1994; Navsaria y cols., 1995; Rothnagel y cols., 1995); la ictiosis ampollosa de Siemens (IBS) es causada por mutaciones en el gen de la queratina K2e (Kremer y cols., 1994; McLean y cols., 1994; Rothnagel y cols., 1994); y mutaciones en los genes de las queratinas K6, K16 y K17 producen paquioniquia congénita (PC) (Bowden y cols., 1995; Mc Lean y cols., 1995).

Es posible que mutaciones en otras queratinas todavía no descritas sean responsables así mismo de enfermedades genéticas de la piel: aproximadamente la mitad de las familias con EPPK estudiadas no tienen mutaciones en el gen de K9, no se ha identificado todavía una pareja natural para K9, pero sería razonable pensar en mutaciones de genes más ubicuos como K1 y K2e, como responsables de EPPK. Recientemente se ha descrito una mutación en el dominio variable V1 de la queratina K1 que conduce a una forma de queratoderma palmoplantar no epidermolítica (Kimonis y cols., 1994).

Todas estas enfermedades se transmiten de forma autosómica dominante, manifiestan degeneración celular y alteraciones en la red de filamentos de queratina de las células que expresan el gen mutante; se caracterizan desde el punto de vista ultraestructural por la presencia de agregados de queratinas que se correlacionan en el caso más frecuente con mutaciones en el comienzo o el final de la alfa-hélice. Las mutaciones originadas en otras posiciones quebrantan menos la organización del filamento (Letai y cols., 1993). La gravedad de la enfermedad se correlaciona con el grado con el que estas mutaciones alteran el ensamblaje de los FI (Coulombe y cols., 1991a; Cheng y cols., 1992; Chipev y cols., 1992; Letai y cols., 1993).

Los ratones transgénicos han sido fundamentales en la predicción y posterior descubrimiento de estas mutaciones en los distintos genes de queratinas y en la confirmación de las mismas como causa directa de la enfermedad genética correspondiente (Coulombe y cols., 1991b; Vassar y cols., 1991; Fuchs y cols., 1992).

Recientemente se han descrito dos casos separados de pacientes diagnosticados de EBS en los que una mutación espontánea en el gen de K14 impide la síntesis de esta proteína (Chan y cols., 1994; Rugg y cols., 1994). En estos individuos se observa una ausencia total de K14, sin que esta deficiencia se vea compensada con la expresión de otras queratinas. Son dos casos en los que una pérdida de función asociada a la ausencia de una proteína de FI produce lesiones epidérmicas severas, pero no letales. Ratones con el gen de la queratina K14 inactivado, presentan un fenotipo muy similar al de los pacientes de EBS, en estos ratones, en ausencia de K14, K5 y K15 forman un red de filamentos residual sobre la que se sintetizan los filamentos de los pares característicos de diferenciación (Lloyd y cols., 1995).

4.3 Función de otros FI

La sobreexpresión, expresión ectópica o inactivación por mutagénesis dirigida de otras proteínas de la familia de los FI ha llevado a conocer aspectos sobre su función.

Los NF se encuentran implicados en la etiología de patologías del sistema nervioso por lo que el estudio de animales transgénicos sobreexpresando proteínas de los NF puede proporcionar modelos de estudio de neuropatologías. La sobreexpresión en ratones transgénicos de NF-L (Xu y cols., 1993) o NF-H (Côté y cols., 1993) conduce a la aparición de síntomas de esclerosis amiotrófica, con la consiguiente degeneración axonal y atrofia del músculo esquelético. Una mutación espontánea sin sentido en el gen de NF-L conduce a una reducción del calibre axonal y temblor generalizado en un mutante *tembloroso* de la codorniz japonesa (Ohara y cols., 1993). La sobreexpresión de NF-M en ratones transgénicos, pone de manifiesto su papel en la regulación de los niveles de NF-L (Tu y cols., 1995), NF-H y en la determinación del calibre axonal (Wong y cols., 1995).

Los ratones que carecen de la proteína GFAP se desarrollan con normalidad, tanto en la fase embrionaria como postnatal, llegan a adultos, se reproducen normalmente y no muestran síntomas de anomalías psicomotoras. Aparentemente, los filamentos intermedios de GFAP no son necesarios para el desarrollo del sistema nervioso (Pekny y cols., 1995).

La inactivación del gen de la vimentina por mutagénesis dirigida en ratones transgénicos permite su desarrollo y reproducción con normalidad, sin aparente fenotipo. La ausencia de vimentina en estos ratones no parece inducir a la síntesis de otros FI que

podieran tener un efecto compensatorio en la función biológica desempeñada por la vimentina (Colucci-Guyon y cols., 1994). Previamente, Capetanaki y cols., 1989, habían descrito la formación de cataratas por sobreexpresión del gen de vimentina; sin embargo no parece ser un efecto específico de este gen.

5. ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE QUERATINAS. EL PROCESO DE CARCINOGENÉISIS EN PIEL DE RATÓN

Los patrones de expresión diferencial y específica de las queratinas (fenómeno que, como se ha indicado requiere una gran coordinación y una compleja regulación) se pueden ver alterados en determinadas condiciones:

- en condiciones experimentales en las que se modifica la composición del medio de cultivo, variando la concentración de calcio; un aumento en la concentración de calcio en el medio de cultivo de queratinocitos induce la diferenciación terminal: cesan la proliferación, se estratifican, expresan los marcadores suprabasales de diferenciación, cornifican y se descaman (Hennings y cols., 1980; Yuspa y cols., 1989). El proceso es de alguna forma reversible si se añaden al medio de cultivo AR, TPA o v-ras^{Ha}: desaparecen los marcadores de la diferenciación terminal incluso a nivel de ARNm (Roop y cols., 1987; Lichti y Yuspa 1988; Cheng y cols., 1991). Recientemente se ha descrito la capacidad del AR de provocar una metaplasia de queratinocitos epidérmicos en aquellos con características de la cavidad oral (Asselineau y Darmon, 1995).

- la expresión de ciertas proteínas virales es capaz de alterar la diferenciación epitelial: BNLF-1, la proteína oncogénica del virus EBV (Wilson y cols., 1990); BHRF1, un homólogo del oncogén bcl-2 (Dawson y cols., 1995); BZLF1, una proteína también del virus EBV que se asocia a la diferenciación terminal aberrante en las células del epitelio lingual de las leucoplasias orales (Young y cols., 1991).

- el proceso de carcinogénesis de piel lleva asociados fuertes cambios en la expresión de los genes de queratinas en los distintos pasos de la progresión tumoral.

5.1 El proceso de carcinogénesis de piel de ratón

La carcinogénesis de piel, constituye un proceso gradual en el que se pueden distinguir las siguientes etapas: iniciación, promoción, progresión premaligna y conversión a malignidad (revisado en Slaga, 1989; DiGiovanni 1992; Yuspa, 1994). En el protocolo más común, la carcinogénesis química en dos etapas (iniciación/promoción), la aplicación tópica

de una dosis de carcinógeno, generalmente DMBA (fase de iniciación), seguida de consecutivas dosis de un promotor tumoral, generalmente TPA (fase de promoción) inducen la aparición de tumores de piel (fases de progresión y conversión). Este protocolo conduce a la aparición de tumores benignos en la piel de los ratones (papilomas) una parte de los cuales regresa espontáneamente (papilomas de bajo riesgo) y otra maligniza a carcinomas (papilomas de alto riesgo). Otro protocolo de carcinogénesis (carcinogénesis completa) consiste en la aplicación repetida de dosis de un carcinógeno (con frecuencia DMBA). Este protocolo conduce a una aparición mayoritaria de carcinomas directamente. El modelo experimental de carcinogénesis de piel nos permite conocer diversos aspectos importantes en la biología, bioquímica, genética, farmacología, etc... de la tumorigénesis, resume la patogénesis del cáncer en tejidos humanos y sirve como prototipo para el estudio y comprensión de determinados tipos de carcinomas, sus alteraciones genéticas y biológicas.

La fase de iniciación, necesita de una sola aplicación de carcinógeno, produce una lesión genética, una mutación, y es esencialmente irreversible. La fase de promoción es inicialmente reversible, convirtiéndose más tarde en un proceso irreversible. Tanto los mecanismos genéticos, como epigenéticos son importantes en el modelo de carcinogénesis de piel (Yuspa 1991). Los carcinomas escamoso-celulares que aparecen en la piel de los animales tratados se clasifican en distintos grados atendiendo a criterios histológicos (Klein-Szanto, 1989; Lever, 1990).

El desarrollo de cada estadio va acompañado de cambios bioquímicos, morfológicos y genéticos. En general, no se conocen las bases genéticas de estas transformaciones progresivas, se cree que implican mutaciones y/o (in)activaciones de proto-oncogenes o genes supresores de tumores (Bowden y cols., 1994); sin embargo, sí se han dilucidado algunos de los cambios genéticos asociados a estadios particulares de la carcinogénesis: se han identificado mutaciones en el gen *c-ras*^{Ha} asociadas a la formación de papilomas (Quintanilla y cols., 1986), otros cambios asociados al locus del cromosoma 7 de ratón donde se localiza *c-ras*^{Ha} incluyen trisomías para el alelo mutado y/o pérdida del alelo normal (Bianchi y cols., 1990, Bremmer y Balmain, 1990), la trisomía del cromosoma 6 es significativa en la progresión premaligna de los papilomas (Aldaz y cols., 1989), se han descrito también alteraciones cromosómicas en el cromosoma 11 que implican al gen supresor *p53* en carcinomas, pero no en papilomas (Ruggeri y cols., 1991), tratamientos tópicos con carcinógenos químicos a ratones que tienen inactivado un alelo de *p53*, tienen como resultado una progresión muy rápida de papiloma a carcinoma (Kemp y cols., 1993). En la conversión a malignidad se ha implicado la expresión de ciertos genes como *c-ras*^{Ha} (Pelling y cols., 1986), proteasas (Matrisian y cols 1986, Ostrowski y cols., 1988), integrinas (Tennenbaum y cols., 1992), y de ciertos factores de transcripción capaces de regular la expresión de estos genes. Se ha sugerido recientemente un papel para *TGFβ* en estos últimos estadios de conversión a malignidad (Caulin y cols., 1995).

En el modelo de carcinogénesis de piel se producen varios cambios en la expresión de queratinas durante la formación de tumores (Nelson y Slaga, 1982; Roop y cols., 1989; Huitfeldt y cols., 1991): los papilomas tempranos expresan además de las queratinas K1, K10, K5 y K14, el par K6/K16 (asociado a condiciones de hiperproliferación) y K17, mientras que en los tumores malignos la síntesis de K1 y K10 sufre un dramático descenso, llegando casi a desaparecer, a la vez que se mantiene la expresión de las otras queratinas mencionadas, de forma que se considera la ausencia de expresión detectable de las queratinas K1 y K10 como marcador de conversión a malignidad (Winter y cols., 1980; Roop y cols., 1988; Roop y cols 1989). La expresión de K13 se modula durante la carcinogénesis de forma contraria al par específico de diferenciación K1/K10, detectándose en los últimos estadios de la formación de papilomas; su presencia constituye un marcador de progresión (Nischt y cols., 1988). K8 se expresa en los últimos estadios de la progresión a carcinoma (Markey y cols., 1991; Larcher y cols., 1992), por lo que se considera un marcador de malignización. Los carcinomas completamente indiferenciados, los más agresivos, presentan células fusiformes que han perdido todas las queratinas de su citoplasma.

También en humanos, K1 y K10 sufren un fuerte descenso (o desaparecen) en todos los tumores foliculares, carcinomas escamoso-celulares, carcinomas escamoso-celulares pobremente diferenciados, (queratosis actínica y epidermis psoriática) (Yoshikawa y cols., 1995).

De esta forma, los anticuerpos monoclonales frente a queratinas específicas se utilizan en la subclasificación de los carcinomas. Algunos patólogos consideran la expresión de queratinas en distintos carcinomas de importancia clínica similar a la subdivisión inmunohistológica de las leucemias (Lane y Alexander, 1990).

Se conocen numerosos factores que afectan a la progresión tumoral: factores dietéticos, químicos, exposición a radiación ultravioleta, edad, estado inmunológico... etc; el fondo genético influye en el riesgo de progresión premaligna (Giménez-Conti, 1992; Henings y cols., 1993; Imamoto y cols., 1993). En general la piel del ratón se considera más sensible a la aplicación de un protocolo de carcinogénesis completa, que a un protocolo de iniciación-progresión (Naito y DiGiovanni, 1989; Iversen, 1991); otras especies como rata, hámster y conejo son menos sensibles, y la cobaya muy resistente. Además hay diferencias marcadas entre las distintas cepas de ratón, considerándose los ratones SENCAR los más sensibles a los protocolos de carcinogénesis, seguidos de los ratones de la cepa DBA-2; la cepas C57BL/6, y BALBc figuran entre las más resistentes (revisado en Naito y DiGiovanni, 1989; DiGiovanni, 1992). Los genes que determinan la susceptibilidad hereditaria a los carcinógenos se desconocen en su mayor parte, y la susceptibilidad parece ser multigénica, con distintos loci genéticos responsables del desarrollo de tumores benignos o malignos

(Naito y cols., 1988; Bangrazi y cols., 1990; Nagase y cols., 1995).

La epidermis es un tejido ideal para desarrollar modelos animales, ya que se puede utilizar como modelo general de los tumores epiteliales. Su accesibilidad permite el seguimiento de las lesiones neoplásicas por simple observación macroscópica, y es posible la obtención de biopsias de los tumores sin necesidad de sacrificar al animal. El modelo de carcinogénesis en piel de ratón es particularmente adecuado para dirigir la expresión de transgenes de interés; modelos experimentales animales se han utilizado para definir e identificar bases genéticas responsables de la susceptibilidad a la iniciación, promoción, progresión premaligna y conversión a malignidad (Bailléul y cols., 1990; Vassar y Fuchs, 1991; Dominey y cols., 1993; Greenhalgh y cols., 1993 a, b, c; Lambert y cols., 1993 ; Auewarakul y cols 1994; ; Wang y cols., 1995; Greenhalgh y cols., 1995; para una revisión ver Greenhalgh y Roop, 1994).

Desconocemos el significado funcional del dramático descenso que sufren las queratinas K1 y K10 en la conversión a malignidad durante la progresión tumoral, o la posibilidad de que su presencia obligada impida el desarrollo de los carcinomas. Por ello nos planteamos elaborar un modelo animal capaz de mantener la expresión de las queratinas K1 y K10 durante todo el proceso de la carcinogénesis de piel de ratón, con el fin de analizar su papel en la misma y los efectos producidos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A pesar de la ubicuidad de los filamentos intermedios en el citoplasma de las células eucariotas, se ha destacado la complejidad de la expresión tan sumamente específica de las queratinas. Estas proteínas se expresan exclusivamente en epitelios, dentro de estos epitelios cada tipo celular expresa una distinta combinación de queratinas que le son específicas, de tal forma que en epitelios estratificados las queratinas son diferentes en las diferentes capas; además el patrón de expresión varía con el desarrollo del animal y en diferentes situaciones patológicas. Esta particular característica de especificidad de expresión, y el conocimiento todavía relativamente limitado que se tiene de su función hace de la familia de genes de los filamentos intermedios de queratinas un modelo ideal para el estudio de la función(es) que desempeña(n) utilizando la expresión ectópica (expresión en otras localizaciones diferentes a la habitual) en ratones transgénicos como aproximación experimental.

No sólo los procesos normales de desarrollo y diferenciación epidérmica presentan una gran complejidad en la expresión de queratinas; el proceso de carcinogénesis en la piel de ratón lleva asociados importantes cambios en la expresión de los genes de las queratinas, que se corresponden con distintos estadios de malignización durante la formación de tumores.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los efectos debidos a la expresión ectópica de los genes de las queratinas humanas K1 y K10 (características de las capas suprabasales de epidermis) en ratones transgénicos. Las localizaciones a las que se ha dirigido la expresión de K1 y K10 son precisamente la de las queratinas K5 (capas basales de epidermis) y K6 (expresión de forma constitutiva en las capas suprabasales de diferentes epitelios estratificados, y de forma inducible en capas suprabasales de piel en situaciones de hiperproliferación). Además, el hecho de que K1 y K10 desaparecen en la conversión a malignidad, mientras que K5 y K6 se expresan durante todo el proceso de carcinogénesis, nos permite estudiar el efecto de la expresión forzada de estas proteínas durante el desarrollo tumoral.

Por tanto, nos hemos valido de esta aproximación experimental (uso de ratones transgénicos para dirigir la expresión de las queratinas K1 y K10 bajo el control de las secuencias reguladoras de las queratinas K5 y K6) con el fin de conocer el significado funcional de tan compleja especificidad de expresión, es decir, analizar *in vivo* si la composición específica de filamentos intermedios de queratinas en las células es de importancia crucial en los procesos de diferenciación epidérmica y/o para el cumplimiento de las funciones celulares.

Este objetivo se desglosó en dos fases desde el punto de vista experimental:

- 1- analizar el efecto de la presencia de queratinas suprabasales en capas basales del mismo tejido; efecto sobre la diferenciación epidérmica, y efecto sobre el propio tejido.
- 2- analizar el efecto de la expresión de queratinas suprabasales (K1 y K10) en el lugar de expresión de otras queratinas suprabasales (K6); efecto sobre la diferenciación epidérmica, y efecto sobre el propio tejido.

Por otro lado, dados los cambios significativos que tienen lugar en la expresión de los genes de queratinas en condiciones de hiperproliferación y durante los distintos pasos de la progresión tumoral en el proceso de carcinogénesis de la piel de ratón y basándonos en la posibilidad de manipulación de la presencia de estas queratinas (inducibilidad de K6, distribución de K5 y K6), nos propusimos:

- 3- analizar las consecuencias de la expresión de K1/K10 *in vivo* en células sometidas a condiciones de hiperproliferación y tumores malignos; conocer el efecto de la expresión forzada de las queratinas K1 y K10 durante los diferentes estadios de la progresión tumoral que culminan en la formación de carcinomas y sobre el desarrollo de los mismos.

La elección de genes de queratinas humanos (K1 y K10) se debe principalmente a la posibilidad de disponer de anticuerpos específicos que permiten la detección precisa del producto del transgén en cada tipo celular dentro del tejido a analizar.

Esperamos, con todo ello, haber conseguido conocer algún aspecto más de la inagotable fuente de estudio que supone la familia de genes de las queratinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

NOTA PRELIMINAR. En este trabajo hK se utilizará para designar a las queratinas humanas, bK a las queratinas bovinas y mK a las queratinas de ratón. bK5 se utiliza para designar a la queratina bovina equivalente a la 5 humana, que antes se conocía como III (o 58KDa en referencias más antiguas), y bK6 β corresponde a la queratina bovina IV* o 56KDa, hK1 a la queratina 1 humana (67KDa) y hK10 designa a la queratina 10 humana (56.5KDa)

1. PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

1.1. Aislamiento de ADN plasmídico y purificación de fragmentos de restricción

El aislamiento de plásmidos a partir de cultivos crecidos en medio LB en pequeño volumen (3 ml), o grande (250 ó 500 ml), se realizó por el método de lisis alcalina (con precipitación con polietilenglicol en el segundo caso), según se describe en Sambrook y cols. (1989).

Los fragmentos de restricción de ADN clonado se purificaron de geles de agarosa de bajo punto de fusión por calentamiento a 65°C, y extracciones con fenol en presencia de NaCl 200 mM.

1.2. Clonaje de plásmidos recombinantes

Las distintas modificaciones de las moléculas de ADN que se hicieron para el clonaje de las construcciones génicas utilizadas en la generación de ratones transgénicos, han implicado la realización de cortes con enzimas de restricción, defosforilación, rellenado de extremos 5' protuberantes con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I o con la ADN polimerasa de T4, ligación de fragmentos de restricción con ADN ligasa de T4, adición de *linkers* sintéticos, etc. que se llevaron a cabo en las condiciones descritas en Sambrook y cols. (1989), con las modificaciones recomendadas en cada caso por el fabricante (Biolabs, Boehringer o BRL). Los pasos seguidos se indican a continuación:

- Clonaje del plásmido pbK5-hK10

El plásmido H10-BKS (donado por Manfred Blessing) contiene el gen de la hK10 desde el codon de iniciación ATG, hasta unas 0,5 Kb 3' del lugar de poliadenilación (inserto de 5,2 Kb) en Bluescript (Stratagene). 5.2 Kb de secuencias reguladoras 5' de gen de bK5, obtenidas por digestión Sall-NruI del plásmido BK5Z (Ramírez y cols., 1994) se introdujeron en el plásmido H10-BKS (abierto Sall-HindIII).

- Clonaje del plásmido pbK5-hK1

Se utilizó el clon genómico λ KH1 que contiene el gen de la queratina 1 completo, y varias Kb de regiones flanqueantes (Johnson y cols., 1985). Se clonó un fragmento de 9 Kb generado mediante digestiones parciales con Sall que abarca desde el segundo codon hasta unas 3Kb 3' del lugar de poliadenilación en pUC8 (Yanish-Perron y cols., 1985) con el sitio PstI modificado. La modificación de pUC8 en el lugar de corte de PstI consistía en la destrucción del mismo tratándolo con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y la creación de un sitio ClaI mediante un *linker* ClaI, de forma que al introducir el fragmento de la queratina hK1 en la orientación correcta, se restaura el codon de iniciación ATG en fase (Manfred Blessing, comunicación personal). En el plásmido resultante (H1MC), el codon de serina (AGT) que sigue al codon de iniciación queda sustituido por un codon de glicina (GGT).

El fragmento de 9 Kb HindIII-EcoRI de H1MC, se clonó en el vector pBKS (Stratagene) abierto con HindIII y EcoRI, obteniéndose el plásmido H1-BKS.

5.3 Kb de secuencias reguladoras 5' del gen de bK5, obtenidas por digestión Sall-NruI del plásmido BK5Z (Ramírez y cols., 1994) se clonaron en el plásmido H1-BKS (abierto con HindIII).

- Obtención del plásmido pbK6 β (-9)

Las 9 Kb de secuencias reguladoras 5' del gen de la queratina bovina 6 β se obtuvieron en dos fases:

- 1- Del plásmido que contiene el fragmento BamHI-KpnI del fago λ K6 (Blessing y cols., 1987) en pUC18, se obtuvo un fragmento de 4 Kb de secuencias 5' obtenidas por digestión BamHI-parcial BglII y se clonó en el vector pJ3 (Morgensten y Land, 1990) abierto con BamHI. El sitio de inicio de la transcripción se ve modificado en un nucleótido al clonar BglII (que contiene el origen de la transcripción) en un sitio de restricción BamHI.

- 2- De este último plásmido se saca el inserto (4Kb de secuencias 5' flanqueantes al gen

de bK6 β) mediante digestión BamHI-parcial BglII y se clona en un plásmido obtenido del fago λ K6 (Blessing y cols., 1987) que contiene el fragmento Eco RI-BamHI desde ~ -8.8 a -4.0 Kb de secuencias 5' en pBKS, abierto con BamHI.

- Clonaje del plásmido pbK6 β -hK10

Se sacaron las 9Kb de secuencias 5' del gen de bK6 β del plásmido pbK6 β (-9) mediante digestión Asp718 y se clonaron en H10-BKS abierto con Asp718.

- Clonaje del plásmido pbK6 β -hK1

De pbK6 β (-9), se obtuvo el inserto mediante digestión ClaI, y se clonó en H1-BKS (abierto con ClaI).

2. CÉLULAS EUCARIOTAS

2.1. Cultivo y conservación

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células fue DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), de Flow, suplementado con penicilina (75 u/ml), estreptomicina (75 μ g/ μ l), ambos de Sigma; glutamina (2 mM final, Sigma) y suero fetal bovino (FBS, de Gibco). Las células se subcultivaron a partir de placas en fase exponencial de crecimiento, mediante tripsinización controlada, con una solución de tripsina-EDTA (1 mM EDTA y 0,025 % peso/volumen) en PBS. Se crecieron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5 % y 95 % de humedad.

Para su preservación, se mantuvieron congelados en N₂ líquido, en criotubos Nunc, en DMEM con 10 % de FBS y 10 % de dimetilsulfóxido.

Se han utilizado células BMGE+H (Schmid y cols., 1983), derivadas de glándula mamaria de vaca, y células MCA3D, cultivos primarios de queratinocitos de ratón inmortalizados con metilcolantreno (Kulesz-Martin y cols., 1983).

2.2. Transfecciones transitorias

La transferencia de genes a células en cultivo se realizó mediante transfecciones transitorias. Estas transfecciones se realizaron mediante precipitados de ADN con fosfato cálcico y posterior choque con glicerol, como se describe en Sambrook y cols., (1989). Se

transfectaron monocapas de 3×10^5 células BMGE+H y MCA 3D (que estaban en fase exponencial de crecimiento), en placas de 6 cm de diámetro con 10 μ g de los plásmidos que se utilizaron en la obtención de ratones transgénicos (estos plásmidos, no digeridos, fueron previamente purificados en gradiente de ClCs); 48 h después se lavaban los cultivos con PBS y se determinaba la presencia de células positivas para hK1 o hK10 según el caso, mediante inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos K_k 8.60 y AE2, en las condiciones descritas en el apartado 4.3.1.

2.3. Cultivos primarios

Los cultivos primarios de queratinocitos se obtuvieron a partir de la piel de lomo de ratones recién nacidos, transgénicos y controles, básicamente como se describe en Hennings y cols. (1980). Se utilizó medio mínimo de Eagle (sin Ca^{++} ni Mg^{++}), suplementado con suero de ternera fetal (FCS), ambos de Gibco, al 8% previamente tratado con chelex (Bio-Rad) y una solución de penicilina y estreptomicina.

3. GENERACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

3.1. Preparación del ADN para microinyección

Las construcciones inyectadas se separaron de las secuencias plasmídicas mediante digestión parcial o total, con las enzimas de restricción adecuadas según los casos, electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (0,4-1%) y purificación del fragmento de ADN de interés a partir del gel, mediante columnas de intercambio iónico Elutip-d (Schleicher & Schuell). Se inyectó ADN a concentraciones entre 2 y 10 μ g/ml, en un tampón conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 0,1 mM.

3.2. Obtención de ratones transgénicos

Los ratones transgénicos se obtuvieron mediante microinyección del ADN correspondiente en pronúcleos de embriones F₂ C57Bl/6xBalb/C, o lo que es lo mismo B6CF₁ y C57Bl/6xDBA/2 (también llamados B6D2F₁), con resultados similares en la obtención de animales transgénicos. La obtención, cultivo, microinyección y transferencia de embriones, así como vasectomías y superovulaciones inducidas con hormonas se realizaron como se describe en Hogan y cols. (1986; 1994) y se resume en la figura 3; la microinyección de los embriones se hizo en un microscopio Nikon Diaphot provisto de óptica Nomarski y micromanipuladores Narishige. Los embriones se transfirieron en estado de 1 o 2 células, sin apreciar diferencias entre ambos, a hembras B6CF₁, o B6D2F₁ de 6 a 8 semanas de edad.

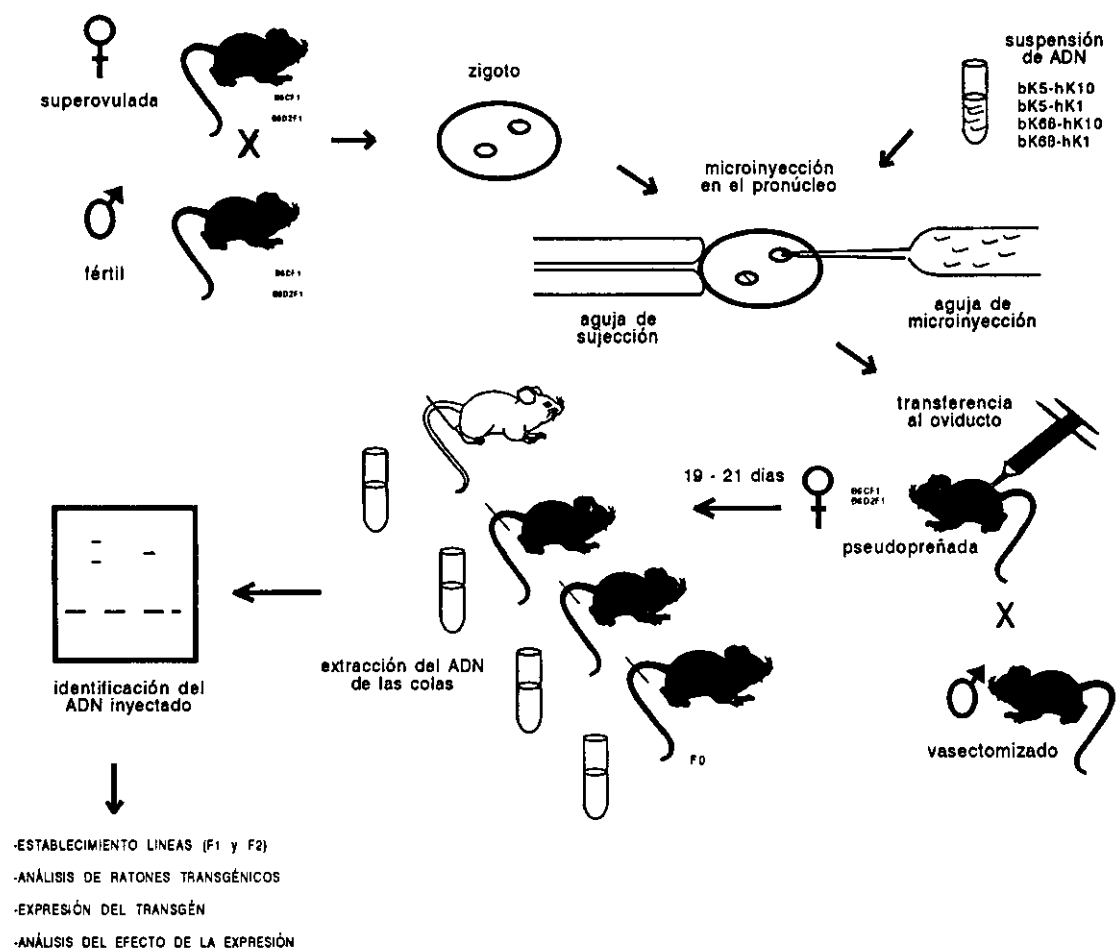


Figura 3. Obtención de ratones transgénicos por microinyección directa del ADN en pronúcleos de embriones fertilizados

En los casos en que fue posible, se mantuvieron líneas de ratones transgénicos mediante cruzamientos con animales B6CF₁, o B6D2F₁, según la cepa a la que perteneciera el fundador.

En esta memoria se consideraran a los ratones transgénicos nacidos de microinyección fundadores F₀; a los hijos de éstos, obtenidos por cruzamientos con ratones no transgénicos, líneas de ratones F₁ hemicigotos; y a los transgénicos obtenidos por cruzamientos de los F₁, F₂, (en este último caso se incluirían los homocigotos, obtenidos por cruzamientos entre padre y madre transgénicos F₁).

3.3. Obtención del ADN genómico

De los animales nacidos tras las microinyecciones, se obtuvo una biopsia de cola de ratones entre 8 y 12 días de edad; de los animales analizados antes de que el desarrollo embrionario llegara a término, se extrajo la membrana de Reichert a los 13.5 ó 15.5 días de gestación; a partir de estas muestras, se aisló ADN genómico empleando extracciones con disolventes orgánicos (como se describe en Hogan y cols., 1986), o sin ellas (Laird y cols., 1991); en este último caso se realizaron las modificaciones siguientes: la lisis se realizó en 700 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 1%, 0,5 mg/ml proteinasa K (Boehringer); el lisado se mezcla exhaustivamente con 250 μ l de NaCl saturado y tras centrifugación (5 min, 12000 rpm) se precipitan los ácidos nucleicos del sobrenadante con 500 μ l de isopropanol.

3.4. Identificación de ratones transgénicos mediante análisis de *Southern blot*

Los animales transgénicos se identificaron mediante *Southern blot* o transferencia del ADN a soporte sólido (Southern, 1975) y posterior hibridación con una sonda marcada radioactivamente. Para su realización, se digerían 5 μ g de ADN genómico con BamHI, en presencia de espermidina 5 mM; tras electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1%, se transferían a membranas de nylon (*Gene Screen Plus*, Dupont) en condiciones alcalinas (Sambrook y cols., 1989) durante 3 a 14 horas. Se prehibridaban de 1 a 3 horas a 42°C con una solución que contenía 5 \times Denhardt, formamida 50%, SDS 1%, 5 \times SSC, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, y se hibridaban de 8 a 14 horas con la misma solución que contenía, además, 10% sulfato de dextrano y 100 μ g/ml de ADN de esperma de trucha, todo ello en estufa de hibridación (Bachofer). Los lavados finales fueron de 30 minutos a 65°C, con SDS 0,1% y 0,1 \times SSC y se expusieron en películas Kodak X-OMAT, Kodak AR o Hyperfilm-MP de Amersham con pantallas intensificadoras (Dupont) a -70°C.

Se emplearon las siguientes sondas:

- para detectar los transgenes bK5-hK10 y bK6 β -hK10: fragmento BamHI de 1 Kb del extremo 3' de H10-BKS; contiene 0.5 Kb de región codificante y 0.5 Kb de región flanqueante 3', denominada hK10.BamHI.
- para detectar los transgenes bK5-hK1 y bK6 β -hK1: fragmento BamHI de 4 Kb del extremo 3' de H1-BKS; contiene 1 Kb de región codificante y 3 Kb de región flanqueante 3', denominada hK1.BamHI.

El marcaje radiactivo se hizo con α^{32} P-dCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol;

Amersham, New England Nuclear o ICN) por la técnica de cebado al azar o *random priming* usando oligonucleótidos 6-mer (Amersham o Boehringer Mannheim), según se describe en Feinberg y Vogelstein, (1983); los nucleótidos no incorporados se eliminaron por cromatografía de exclusión en columnas de Sephadex G-50 (Pharmacia).

4. ANÁLISIS DE RATONES TRANSGÉNICOS

4.1. Obtención y tratamiento de las muestras

Los animales eran sacrificados por dislocación cervical o inhalación de éter etílico; se diseccionaban los tejidos o los tumores a analizar, y se conservaban de uno u otro modo en función del destino que se fuera a dar a las muestras:

- se congelaban en medio OCT (Jüng; Leica Instruments) a -20°C, conservándose a esta temperatura hasta el momento de posteriores análisis
- se fijaban en formol 10% en PBS o en alcohol 70%, y se conservaban a 4°C
- algunos animales se perfundieron, cuando su estado de debilidad era notorio, con formol 10% en PBS, conservándose enteros en formol hasta su análisis
- las muestras utilizadas en la microscopía electrónica se trataron según se describe en el apartado 4.4.

4.2. Análisis histológico

Para el análisis histológico, las muestras fijadas se deshidrataron e incluyeron en parafina Gurr o Vogel con punto de fusión 56-57°C. Se obtuvieron cortes seriados de 5 a 7 μm de los diferentes tejidos o tumores en un microtomo 1140 Autocut (Reichert-Jüng) o 1512 (Leitz), y se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma).

Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina montándose con EuKitt (Kindler) o DPX (BDH)

Las preparaciones se visualizaron en microscopios Nikon Labophot o Diaphot, fotografiándose en este último con película Kodak Ektar 25 ASA.

4.3. Análisis inmunohistoquímico

4.3.1. Inmunofluorescencias indirectas

Se obtuvieron secciones de 6 a 8 μm de los diferentes tejidos en un criostato Frigocut 2800N o Cryocut 3000 (Reichert-Jüng), colocándose en cristales portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma). Las secciones se conservaban a -20°C hasta su análisis.

Una vez atemperados los portaobjetos, se suprimieron los restos de OCT mediante dos lavados a temperatura ambiente en PBS; se fijaron a -20°C durante 10 minutos en acetona. Tras 5 minutos de secado, se repitieron los lavados en PBS y se incubó 2 horas a 37°C con el anticuerpo primario correspondiente. Tras tres lavados de 10 minutos en PBS, se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Las preparaciones se lavaron durante un total de 30 min en PBS, se montaron con Moviol (Hoechst), y se visualizaron y fotografiaron en un microscopio Axiophot de Carl Zeiss, equipado con sistema de epifluorescencia; la película empleada fue HP5 plus (400 ASA), de Ilford.

Los anticuerpos primarios se resumen en la tabla I. Se utilizaron anticuerpos secundarios dirigidos contra las inmunoglobulinas en las que se obtuvieron los primarios (ratón, conejo, rata y cobaya) conjugados a isotiocianato de fluoresceína o rojo Texas (Jackson Immunoresearch Laboratories).

Nombre	Carácter/especie	antígeno reconocido	procedencia
AE2	mo/M	hK1,hK10	ICN
K _K 8.60	mo/M	K10,K11,(K1)	Sigma
LH1	mo/M	K10	E.B.Lane
LH2	mo/M	K10	E.B.Lane
LH3	mo/M	K10	E.B.Lane
RKSE60	mo/M	K10	ICN
EAB904	mo/M	hK1	Enzo
KA5	mo/M	hK1	R.Nagle
TROMA-1	mo/R	K8	R.Kemler
GPCK	mo/Gp	Ks epidérmicas	Sigma
RK5	po/Rb	K5	D.R.Roop
RK6	po/Rb	K6	D.R.Roop
RK1	po/Rb	K1	D.R.Roop
RK10	po/Rb	K10	D.R.Roop
RK13	po/Rb	K13	D.R.Roop
LL002	mo/M	K14	E.B.Lane
α -BrdU	mo/R	5-bromodeoxiuridina	S.Mittnacht
α -loricrina	po/Rb	loricrina	S.H.Yuspa

Tabla I. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados. mo:monoclonal, po:policlonal, M:ratón, R:rata, Rb:conejo, Gp:cobaya.

4.3.2. Inmunoperoxidasas. Técnica de avidina-biotina

Se analizaron secciones histológicas incluidas en parafina mediante tinción por inmunoperoxidasa. Se lavaron en PBS y se incubaron 2 horas con el anticuerpo primario correspondiente a temperatura ambiente; tras tres lavados de 10 minutos en PBS, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, dirigido contra las inmunoglobulinas del animal a partir del cual se obtuvo el primario, biotinilado (Vector Laboratories, Inc.). Las preparaciones se lavaron durante un total de 30 minutos en PBS y se le añadió el complejo avidina-peroxidasa (Vectastain, ABC kit, Vector Laboratories Inc.),

se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente; se hicieron dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno, por último se añadió el sustrato cromógeno, (diaminobencidina y H_2O_2) y se controló la reacción al microscopio óptico, parándose la misma en H_2O . Posteriormente se realizó una contratinción con hematoxilina, se montaron con Eukitt (Kindler) o DPX (BDH) y se visualizaron en microscopios Nikon Labophot o Diaphot, fotografiándose en éste último con película Kodak Ektar 25 ASA.

4.4. Análisis ultraestructural por microscopía electrónica

Para la observación de la piel del lomo en cortes semifinos y ultrafinos, se tallaron pequeños bloques. Estas muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en tampón 0.1 M pH 7.4-7.6, durante media hora a 4°C, realizándose posteriormente tres lavados de 30 minutos con solución tampón y una postfijación en tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato Sörensen 1 h a 4°C, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina Epon 812.

Para la realización de los cortes semifinos y ultrafinos se utilizó un ultramicrotomo LKB V. Las cuchillas de vidrio, de 45°, fueron confeccionadas en un Knifemarker (LKB) y los bloques fueron tallados en un aparato tallador Tm 60 (Reichert-Jüng).

Los cortes semifinos de 0.5-1 μm de espesor se depositaron sobre gotas de agua bidestilada, colocadas en un portaobjetos, y se extendieron con ayuda de una platina caliente (90°C). Los cortes ultrafinos, de aproximadamente 70nm (interferencia plateada-dorada), se montaron sobre rejillas de cobre de 150 mesh, o bien 100 mesh con película soporte de formvar al 0.025%.

Los cortes semifinos fueron teñidos en caliente, con solución acuosa de azul de toluidina al 1%. Para los cortes ultrafinos se realizó una doble tinción positiva con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Los estudios ultraestructurales se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 CX, del Servicio de Microscopía electrónica de la Facultad de Veterinaria de León.

4.5. Análisis de ARN por *Northern blot*

Se extrajo ARN de secciones de aproximadamente 3 cm de piel de la cola,

congeladas en N₂ líquido. Para la obtención de ARN se utilizó el método del fenol ácido, descrito en Chomczynski y Sacchi, (1987), con las siguientes modificaciones: se emplearon 5 ml de solución D, homogeneizando durante 1 min en Ultra-Turrax; tras la obtención del último precipitado se trató con proteinasa K (100 µg/ml) durante 1 h a 37°C en acetato sódico 0,3 M pH6, EDTA 1 mM, SDS 0,1%; se hicieron dos extracciones con fenol: cloroformo y se precipitó con etanol y acetato sódico.

De los ARNs aislados, 7 µg se separaron como se describe en Lehrach y cols. (1977) en geles de agarosa con tampón MOPS (Sigma) y 6% formaldehído. La transferencia se hizo por capilaridad durante la noche con 20× SSC a membranas de nylon (*Gene Screen Plus*, Dupont); la membrana fue irradiada 2 minutos con luz ultravioleta y se tuvo 2 horas a 70°C; la tinción del ARN en la membrana se realizó con azul de metileno, como se describe en Sambrook y cols. (1989). La hibridación se realizó en las mismas condiciones descritas para el *Southern blot*.

Las sondas que se han empleado son:

- para hK10; un fragmento ClaI de 600 pb del extremo 5' del gen de hK10, específica de hK10, para detectar la expresión del transgén
- para β-actina; el fragmento EcoRI- HindIII de 280 pb del gen β-actina de rata (procedente del plásmido pSPβ-act72, de A. Alonso) como control del ARN realmente cargado en cada pocillo.

El mismo ARN, se hibrida con más de una sonda, utilizando el mismo filtro, retirándose el ADN anteriormente hibridado, mediante 3 lavados de 2 min en SDS 0,01% y 0,01× SSC a ebullición.

Las autorradiografías eran densitometradas (mediante un sistema general de proceso digital y análisis de imagen MICROM-IP 2.0, Microm España) y normalizadas por el valor de β-actina.

4.6. Extracción de FI y geles de proteínas

La extracción de queratinas epidérmicas se realizó básicamente como se describe en Achtstätter y cols.(1986). Consiste en la homogeneización del tejido en 4 ml de tampón de baja concentración salina en presencia de detergentes e inhibidores de proteasas (NaCl 150mM, ditioneitol (DTT) 1mM, tritón X-100 0.1%, Tris-HCl 10mM pH 7.5 y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1mM); posteriormente, se recoge la fracción insoluble mediante centrifugación de 10 minutos a 4°C Y 1200 rpm en rotor JA20 (Beckman); tras

repetir el proceso un total de 4 veces (las dos últimas se utiliza un tampón de alta concentración salina, con KCl 1.5 M y NaCl 10 mM). La fracción insoluble, que contiene las queratinas se resuspende en tampón de Laemli y se guarda a -20°C.

El análisis de las fracciones así aisladas se realizó, fundamentalmente por electroforesis en geles de acrilamida al 8.5% en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (Laemmli, 1970). Algunas muestras se sometieron a análisis por electroforesis bidimensional, siguiendo el método descrito por O'Farrell y cols. (1977).

Las proteínas resueltas en geles se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (Schleider & Schuell) en tampón fosfato. Para la detección de las queratinas fijadas a estos filtros, se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo diluido en TTBS (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20). Los filtros fueron posteriormente incubados con el anticuerpo secundario, que fue anti-IgG de conejo o ratón biotinilado (Vector Laboratories, Inc.) durante 30 minutos en el mismo tampón. Después se añadió el complejo avidina-peroxidasa (Vectastain, ABC kit, Vector Laboratories Inc.). Los complejos inmunes se revelaron utilizando diaminobencidina como sustrato (Harlow y Lane, 1988).

4.7. Análisis de la actividad mitótica

Se inyecta a los ratones (inyección intraperitoneal) con BrdU (Sigma) 100mg/Kg de peso en NaCl 0.9% 1h antes de sacrificarlos. Las muestras se fijan en etanol 70% a 4°C durante 3 días, y se incluyen en parafina. Los cortes histológicos se desparafinan, se deshidratan y se tratan con HCl 1N durante 40 minutos a 37°C. Se lavan en PBS (6 lavados de PBS) y se procesan como el resto de las inmunofluorescencias indirectas descrito en el apartado 4.3.1.

4.8. Tratamientos tópicos con AR y TPA

AR: se aplicaron diariamente en la piel de la cola 30 µg de ácido retinoico *todo trans* (AR; Sigma) durante 14 días.

TPA: los tratamientos con TPA (Sigma) en la piel de la cola de los animales se realizaron aplicando 7 dosis de 20 nmoles en días alternos; en la piel del lomo se aplicaron dos dosis de 20 nmoles a días alternos. Para analizar la actividad mitótica en piel del lomo de animales tratados con TPA, se aplicó una dosis de 20 nmol en 200 µl de acetona 12h antes

de la inyección con BrdU.

Todas las soluciones se conservan a -20°C en la oscuridad. Tanto el AR como el TPA se disuelven en acetona; 100 μl extendidos a lo largo de la cola, y 200 μl extendidos en la piel del lomo del dorso del animal en cada dosis.

4.9. Protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. Análisis de los tumores

Se inician los protocolos de carcinogénesis en ratones con 7 semanas de edad. A esta edad, todos los folículos pilosos se encuentran en anagén. En este momento, (que se asocia a la proliferación de las células *stem* del folículo piloso, consideradas por algunos como las células blanco de los carcinógenos) son más sensibles a los carcinógenos químicos (Miller y cols., 1993).

Se desarrolló un protocolo de carcinogénesis completa que consistía en la administración tópica de 7,12-dimetil-benzantraceno, DMBA (Sigma) a ratones transgénicos F₁ C57BL/6xBalb/C y hermanos de camada no transgénicos con las siguientes dosis:

Iniciación: 400 nmol a las 7 semanas de edad

Progresión: 40 nmol 2 veces por semana hasta 14 semanas

80 nmol 2 veces por semana desde la semana 14 hasta 18 semanas

Los tumores se revisaban semanalmente, y se sacrificaban los animales cuando el tamaño de la lesión desarrollada era de 1.5 cm². A las 30 semanas se sacrificaron los últimos animales. Las dosis de carcinógeno administradas en este protocolo son dosis muy altas, y durante tiempos largos (Naito y DiGiovanni 1989; DiGiovanni 1992).

El DMBA se disuelve en acetona y se guarda a -20°C preservándolo de la luz. Se administra cada dosis en 200 μl sobre la piel del lomo de los animales.

El aspecto macroscópico de los carcinomas consiste en una úlcera superficial con un borde ancho, a menudo recubierto por una costra. En el carcinoma de células escamosas se distinguen cuatro grados de severidad de acuerdo con la proporción de células maduras (Lever y Schaumburg-Lever, 1990). En el grado 1 las células diferenciadas superan el 75%, se mantienen los puentes intercelulares, y se observan abundantes perlas córneas; en el grado 2 se estima un 50% de células maduras, con perlas córneas menos abundantes; en el grado 3 (25% de células diferenciadas) los núcleos de las células tumorales muestran atipia, muchas áreas carecen de queratinización, y no se observan perlas córneas; en el grado 4 las células maduras no superan el 25%, casi todas son atípicas, la queratinización es mínima o nula.

El procesado de las muestras para la obtención de secciones histológicas se realizó como se describe en los apartados 4.1., 4.2., y 4.3.2.

Los diagnósticos los realizó el Dr. Claudio Ballestín del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE K1 Y K10 EN QUERATINOCITOS BASALES

Con el fin de estudiar la síntesis, ensamblaje, posible función y efecto de la expresión de las queratinas humanas K1 y K10, características de la diferenciación epidérmica, en las capas basales de epitelios estratificados en ratones transgénicos, los ADNs genómicos humanos que codifican para estas proteínas (Johnson y cols. 1985; Rieger y Franke 1988) se pusieron bajo el control de las secuencias reguladoras de la queratina bovina bK5 capaces de dirigir expresión específica a estos tipos celulares (Ramírez 1993; Ramírez y cols. 1994).

Esta estrategia permite dirigir la expresión de las queratinas K1 y K10 a diversos tejidos en los que habitualmente sí se expresan, pero a distinto tipo celular dentro del tejido a analizar. Nos basamos en la expresión ectópica de los genes de queratinas para conocer la importancia del patrón específico celular de las queratinas, y estudiar su papel en la estructura y función celular.

1.1. CONSTRUCCIONES GÉNICAS EMPLEADAS Y SU EXPRESIÓN EN CÉLULAS EN CULTIVO

Se utilizó el promotor de la queratina 5 bovina para dirigir la expresión de las queratinas humanas K1 y K10 hacia capas basales de epidermis. La figura 4a muestra el gen de la hK10 (desde el origen de la transcripción) y 0.5 Kb de secuencias flanqueantes 3' bajo el control de las 5.2 Kb de secuencias reguladoras del gen de la queratina bovina bK5. En la figura 4b se muestra el mismo promotor situado en 5' respecto al gen de hK1, y 3Kb de secuencias 3' flanqueantes.

Para comprobar la funcionalidad de los genes clonados, se realizaron transfecciones transitorias de los plásmidos anteriormente mencionados en células BMGE+H y MCA3D (transfecciones con cada uno de los plásmidos por separado). A las 48h se analizó por tinciones de inmunofluorescencia indirecta la presencia de las queratinas K1 y K10 usando los anticuerpos K_κ 8.60 y AE2, comprobándose la existencia de células transfectadas expresando el producto derivado del correspondiente transgén, integrado en el citoesqueleto formando filamentos (figura 5). De esta forma se comprobó que las construcciones tienen capacidad de sintetizar las proteínas transgénicas (al menos en células en cultivo), y que, por lo tanto, son funcionales.

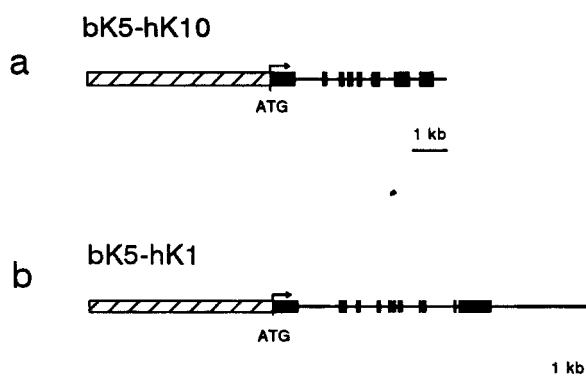


Figura 4. Construcciones génicas que contienen los genes de la queratinas humanas hK10 (a) y hK1 (b) bajo el control del promotor de bK5. Los rectángulos rayados corresponden a las secuencias reguladoras del gen de la queratina bovina bK5. Los rectángulos negros indican los exones y las líneas horizontales indican los intrones y secuencias 3' de los genes humanos. Las flechas señalan el origen de la transcripción.

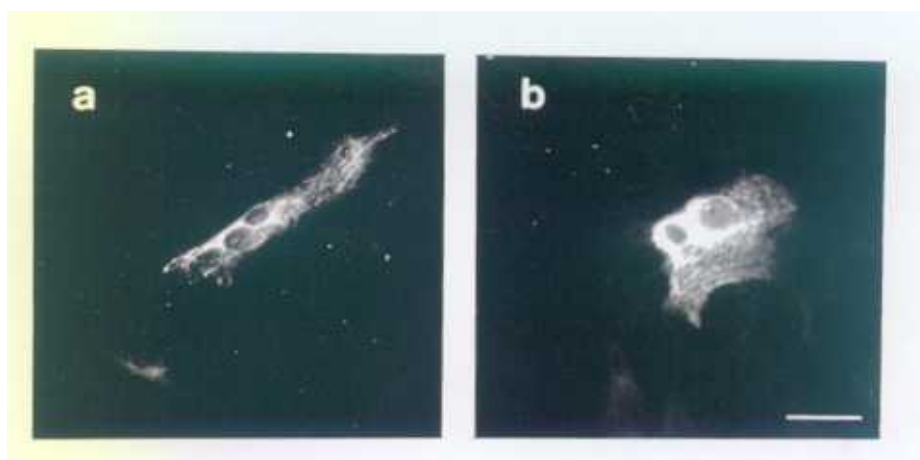


Figura 5. Transfecciones transitorias en células BMGE+H (a) y MCA3D (b) con los transgenes de bK5-hK10 (a) y bK5-hK1 (b). Inmunofluorescencias indirectas con los anticuerpos monoclonales K₁8.60 (a) y AE2 (b) que reconocen de forma específica las queratinas K1 y K10. Barra, 7 μm.

1.2. GENERACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS

1.2.1. Construcción bK5-hK10

De la microinyección con la construcción bK5-hK10 se obtuvieron 234 animales. La identificación de los ratones transgénicos se realizó por análisis de *Southern blot* de ADN genómico, extraído de la cola de estos animales a los 10-12 días de edad, digerido con BamHI e hibridado con un fragmento BamHI de ~1Kb del extremo 3' del gen de K10 (sonda hK10.BamHI, figura 6a). La presencia de una banda de 1Kb indica la presencia del transgén, y se obtuvo sólo en 5 de los animales (figura 6b), revelando que solamente 5 de los animales nacidos, eran transgénicos, lo que significa un porcentaje de transgénicos respecto al total de nacidos del 2.3%, muy inferior al 10-15% esperable, en principio, para un transgén neutro. De estos fundadores se originaron líneas transgénicas (que en adelante se nombrarán con el número del fundador que las originó). El cálculo del número de copias integrado en cada uno de los casos se realizó por comparación de la intensidad de bandas obtenidas en las distintas líneas transgénicas con diferentes cantidades del transgén, que equivalen a diferente número de copias, obteniéndose un total aproximado de 5, 5, 50, 75 y 100 copias por célula para las líneas 665, 825, 1213, 821 y 1227 respectivamente (figura 6b). El mismo filtro, se rehibridó con la sonda Thy1 (gen de copia única en el genoma del ratón (Grosveld, 1987), que se utilizaba como control del ADN realmente cargado en cada pocillo (no mostrado).

Para comprobar que la estructura del transgén era correcta en todos los casos, y no se habían integrado copias reordenadas del mismo, se hibridó ADN genómico de las 5 líneas transgénicas, digerido con EcoRI, con un fragmento SalI-NruI que abarca la secuencia reguladora bovina (sonda bK5, figura 6a). Se obtuvo para todos los casos una integración de las copias del transgén en orientación cabeza-cola, sin detectarse reordenaciones en las copias integradas (figura 6c).

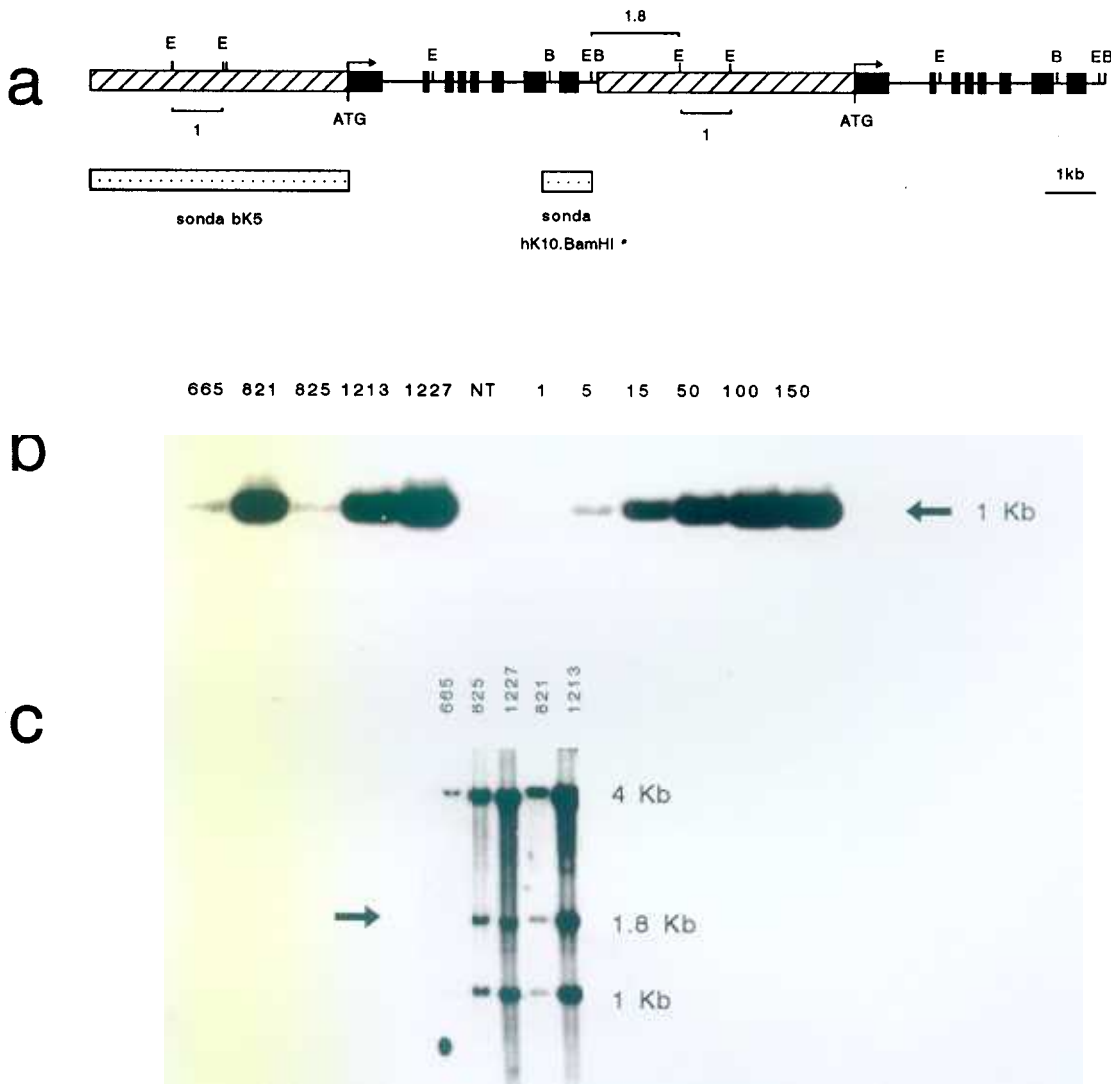


Figura 6. Estructura y n° de copias del transgén en líneas portadoras de bK5-hK10. **a)** Esquema de los transgenes integrados en orientación cabeza-cola. B:BamHI, E:EcoRI. **b)** Análisis por *Southern blot* de 5 µg de ADN genómico de ratones transgénicos digeridos con BamHI en el siguiente orden: líneas 665,821,825,1213,1227, no transgénico (NT), cantidades crecientes del transgén; en 1, 5, 15, 50, 100, 150 hay respectivamente 5, 25, 75, 250, 500, 750 pg del transgén que representan 1, 5, 15, 50, 100, 150 copias por célula. Se utilizó la sonda hK10.BamHI, del extremo 3' de la queratina hK10. La aparición de una banda de ~1Kb indica la presencia del transgén (flecha). **c)** *Southern blot* de ADN genómico de ratones transgénicos de las líneas 665,825,1227,821,1213 digerido con EcoRI. Como sonda se utilizó bK5 (fragmento SalI-NruI que contiene el promotor completo). La aparición de una banda de ~1.8 Kb es indicativa de las uniones cabeza-cola (flecha). No se han producido reordenaciones detectables en el transgén, ya que se observa el patrón de bandas esperado en todos los casos.

No se observó ninguna anomalía, ni alteración fenotípica en ninguno de los fundadores de las líneas que albergaban el transgén de la queratina K10; sin embargo al generar líneas de ratones descendientes de los fundadores se observaron marcadas diferencias dependiendo del número de copias integrado:

a) los ratones generados a partir de los fundadores que habían integrado un número reducido de copias (en torno a 5 copias, líneas **665**, y **825**), eran sanos y presentaban una duración media de vida normal, tanto para los heterocigotos como para los homocigotos (doble número de copias, ya que se obtienen a partir de cruces entre heterocigotos).

b) los ratones generados a partir de los fundadores **821**, **1213**, y **1227**, con alto número de copias, presentaban claras anomalías y alteraciones fenotípicas que se manifestaban a partir de la tercera semana de vida y consistían en tamaño pequeño, temblor fino, paresia en las extremidades posteriores y viabilidad reducida, no superando en ningún caso los tres meses de vida. Además, la transmisión del transgén a la descendencia de la fundadora **1213**, era de un 16%, y de un 29% para el fundador **1227**, inferior al 50% esperado según la herencia mendeliana del transgén, lo que sugiere un mosaicismo en estos fundadores. Dada la debilidad manifiesta que presentaban los individuos transgénicos de estas líneas y su escasa viabilidad, en ninguno de los casos fueron posibles cruzamientos entre transgénicos para obtener homocigotos. Tampoco fueron posibles cruzamientos con animales no transgénicos para el mantenimiento de líneas, por lo que los animales de que se dispuso fueron exclusivamente descendientes directos de los fundadores.

La fundadora **821** murió tras criar una sólo camada con tres descendientes transgénicos, por lo que los datos que se tienen de esta línea y el material susceptible de análisis es, lamentablemente, muy escaso.

Estos datos se resumen en la tabla II.

línea	nº copias	alteraciones fenotípicas
665	~ 5	-
825	~ 5	-
1213	~ 50	+
821	~ 75	+
1227	~ 100	+

Tabla II. Caracterización de las líneas transgénicas bK5-hK10.

1.2.2. Construcción bK5-hK1

De la microinyección en pronúcleos de embriones de ratón con la construcción bK5-hK1 nacieron 180 animales. La identificación de los ratones transgénicos por *Southern blot* se realizó hibridando ADN genómico de todos los animales nacidos, digerido con BamHI, con un fragmento BamHI de 4 Kb del extremo 3' del gen de K1 (sonda hK1.BamHI, figura 7a). La presencia del transgén se revela por la aparición de una banda de 4Kb. El análisis realizado puso de manifiesto que sólo 5 animales eran transgénicos (figura 7b). En tres de las líneas obtenidas (líneas 508, 868, y 878), algunas copias del transgén se integraban de forma reordenada, como lo sugiere la presencia de bandas extra en el análisis por *Southern Blot*. Lo más frecuente es que las copias del transgén se integren en un sólo punto cromosómico, y se ordenen en disposición cabeza-cola (Palmiter y Brinster, 1986), aunque se han descrito

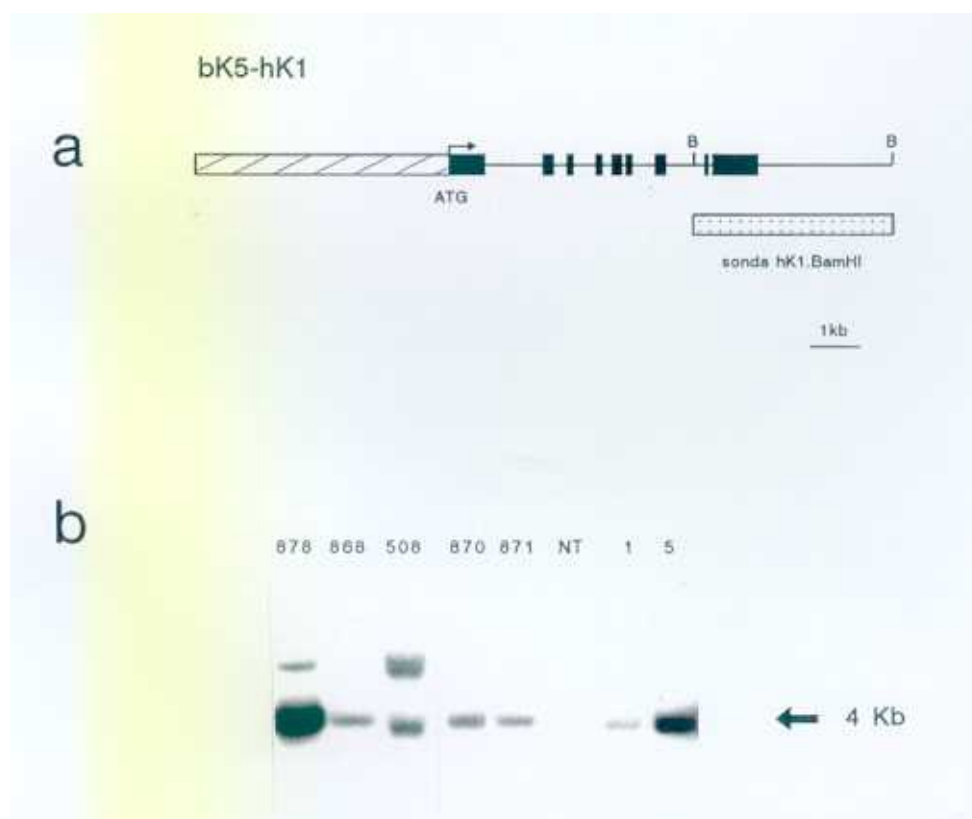


Figura 7. Identificación por *Southern blot* de ratones transgénicos bK5-hK1. **a)** Esquema del transgén y la sonda utilizada en el *Southern blot*. **b)** Se digirieron 5 μ g de ADN genómico procedente de cola con BamHI. Para detectar el transgén se utilizó la sonda hK1.BamHI. La aparición de una banda de \sim 4Kb indica la presencia del transgén (flecha). Los carriles 878, 868, 508, 870, 871 corresponden a las líneas 878, 868, 508, 870, 871 respectivamente, NT; ADN de ratón no transgénico; en los carriles 1, 5 hay cargadas 1 y 5 copias respectivamente del transgén por célula.

excepcionalmente secuencias de ADN que presentan inestabilidad estructural en ratones transgénicos (Collick y cols. 1994). En nuestros animales con copias reordenadas, principalmente en la línea 878, la mayoría de las copias se integraban completas en disposición cabeza-cola, y algunas se integraban reordenadas o parcialmente delecionadas (comprobado al hibridar con una sonda del transgén completo el ADN digerido con BamHI, no mostrado).

Ninguno de los fundadores transgénicos para el gen de la queratina K1, ni de sus descendientes presentaba anomalía fenotípica alguna o característica morfológica que los distinguiese de sus hermanos no transgénicos, ni reducción en la duración media de vida.

1.3. EXPRESIÓN DE K10 EN TEJIDOS DE ANIMALES bK5-hK10 ADULTOS

Como se ha mencionado, nos basamos en la expresión ectópica en ratones transgénicos, es decir, expresión en otro lugar distinto al de expresión habitual, para dirigir la expresión de la queratina humana hK10 a órganos y tejidos en los que normalmente sí se expresa, pero a distinto tipo celular. En la situación *in vivo* la síntesis de las queratinas de capas basales (K5/K14) y específicas de diferenciación (K1/K10) son excluyentes, por lo que los epitelios estratificados expresan todas las queratinas antes mencionadas, si bien en tipos celulares distintos.

Con el fin de conocer y examinar el patrón de distribución del producto del transgén bK5-hK10 en diferentes tejidos de animales transgénicos adultos, e identificar en qué células se localiza la proteína transgénica, se realizaron inmunofluorescencias indirectas con el anticuerpo AE2, específico de las queratinas K1 y K10 humanas (ver Materiales y Métodos) en todas las líneas. Criosecciones de ratones no transgénicos usados como control, no reaccionaron con este anticuerpo (no mostrado). Se realizaron, además, tinciones con otros anticuerpos que reconocen la queratina K10. De todos los anticuerpos ensayados en el análisis de los ratones transgénicos, (recopilados en la tabla I), sólo fue posible el reconocimiento absolutamente específico de la queratina humana hK10 en los tejidos de ratón, en las tinciones realizadas utilizando el anticuerpo monoclonal AE2, ya que el resto de los anticuerpos ensayados (monoclonales obtenidos en ratón), reconocen además de la proteína humana, la queratina murina mK10, siendo por lo tanto inespecíficos en los tejidos en los que se expresa esta proteína.

1.3.1. Expresión del transgén coincidente con mK5

Los ratones transgénicos bK5-hK10 son portadores de un transgén en el que las secuencias reguladoras de la queratina bK5 dirigen la expresión de la queratina hK10 a los tipos celulares que expresan la queratina K5. La queratina K5 se localiza en las capas basales de los epitelios estratificados de diferentes especies (Moll y cols. 1982; Byrne y Fuchs 1993; Ramírez 1993; Ramírez y cols. 1994); por lo tanto, el patrón de distribución esperado para la proteína K10 transgénica correspondería a aquel que se conoce para la queratina K5, es decir, principalmente los estratos basales de epitelios estratificados. Como se detallará a continuación, éste no ha sido estrictamente el patrón de expresión de la queratina hK10 transgénica en todas las líneas de ratones transgénicos analizadas, ya que además de en los lugares de expresión de la queratina K5, se ha constatado la presencia del transgén en otros tipos celulares en los que no se detecta expresión de K5 (fenómeno que designamos como expresión genuinamente ectópica). En la tabla III, se presenta un resumen del análisis de la expresión por inmunofluorescencia de las 5 líneas transgénicas, y en la figura 8 diversos ejemplos representativos de los tejidos en los que las queratinas hK10 y mK5 son coincidentes; es decir, en los tejidos en que se ha detectado la expresión de ambas queratinas (hK10 y mk5), o la ausencia de las mismas. La expresión de la queratina basal endógena mK5 no parece haber sido afectada por la ganancia de expresión de hK10 en las células basales, al menos por lo que se puede detectar por experimentos de inmunofluorescencias indirectas (resultados no mostrados).

TEJIDO	LÍNEA					
	665 ^a	825 ^a	821 ^a	1213 ^a	1227 ^a	mK5
EPIDERMIS:						
lomo	+	+	++	+++	+++	+
plantar	+	+	++	+++	+++	+
cola	+	+	++	+++	+++	+
FOLÍCULOS	+(VRE)	+(VRE)	+(VRE)	++(VRE)	++(VRE)	+(VRE)
EPITELIOS INTERNOS:						
lengua	+	+	++	+++	+++	+
paladar	+	+	++	+++	+++	+
epit. nasal	+	+	+	++	++	+
esófago	+	+	++	+++	+++	+
estómago aglandular	+	+	NA	++	++ ¹	+
GLÁNDULAS:						
salivales	+	+	++ ²	+++ ²	+++ ³	+ ²
sebáceas	+	+	+	+	+	+
plantares	+	NA	+	++	++	+
OTROS:						
vejiga	NA	NA	+	+	+	+
timo	+ ⁴	+ ⁴	+	+++ ⁶	+++ ⁶	+ ⁵
tráquea	NA	NA	NA	+++	+++	+
riñón	-	-	+ ⁷	++ ⁸	++ ⁸	+ ⁷
bazo	-	-	-	-	-	-
corazón	-	-	-	-	-	-
músculo	-	-	-	-	-	-

Tabla III. Resumen de la expresión del transgén hK10 y de la queratina endógena mK5 en ratones transgénicos bK5-hK10 y de la queratina mK5 en ratones control. Detección por inmunofluorescencia de hK10 y mK5 con los anticuerpos AE2 y RK5, respectivamente.

a: intensidad de tinción por inmunofluorescencia percibida con el anticuerpo monoclonal AE2

En la columna mK5, se señalan los tejidos en los que se detecta expresión de la queratina mK5 (+), o ausencia de la misma (-), tanto en los transgénicos bK5-hK10, como en ratones control

NA: no analizado, VRE:vaina radicular externa, 1:expresión también en serosa, 2:conductos, 3:conductos y algunas células secretoras (gránulos), 4:pocas células, 5:células reticulares de la región medular, 6:todas las células reticulares (corticales y medulares), 7:pelvis renal, 8:pelvis renal y tubos colectores

La proteína transgénica se detectó en las capas basales de epitelios estratificados, coincidente con la queratina K5 endógena, con un patrón de distribución esperable según el obtenido al caracterizar las 5.2Kb de secuencias reguladoras bovinas que utilizamos como promotor en el transgén (Ramírez, 1993, Ramírez y cols. 1994). En general, en todos estos epitelios la expresión es continua. La figura 8 muestra resultados representativos de tinciones por inmunofluorescencias de tejidos transgénicos de distintas líneas con anticuerpos que reconocen la queratina K10 humana. Hay algunas excepciones a la coincidencia de hK10 y mK5: la queratina endógena mK5 se localiza en los conductos de las glándulas salivales, mientras que en la línea 1227, se encontraron células positivas para el anticuerpo AE2 en conductos y células secretoras (no mostrado), también en esta línea se observó expresión en la serosa de estómago (figura 8h) sin detectarse expresión de mK5; es interesante resaltar que en el timo mK5 se circunscribe a las células reticulares de la región medular (figura 9a), mientras que en las líneas 1213, y 1227, se detectó la presencia del transgén en células corticales y medulares (figura 9b), en estas mismas líneas se detectó la presencia de queratina humana en pelvis renal y tubos colectores del riñón (figura 8j), encontrándose la endógena tan sólo en pelvis renal.

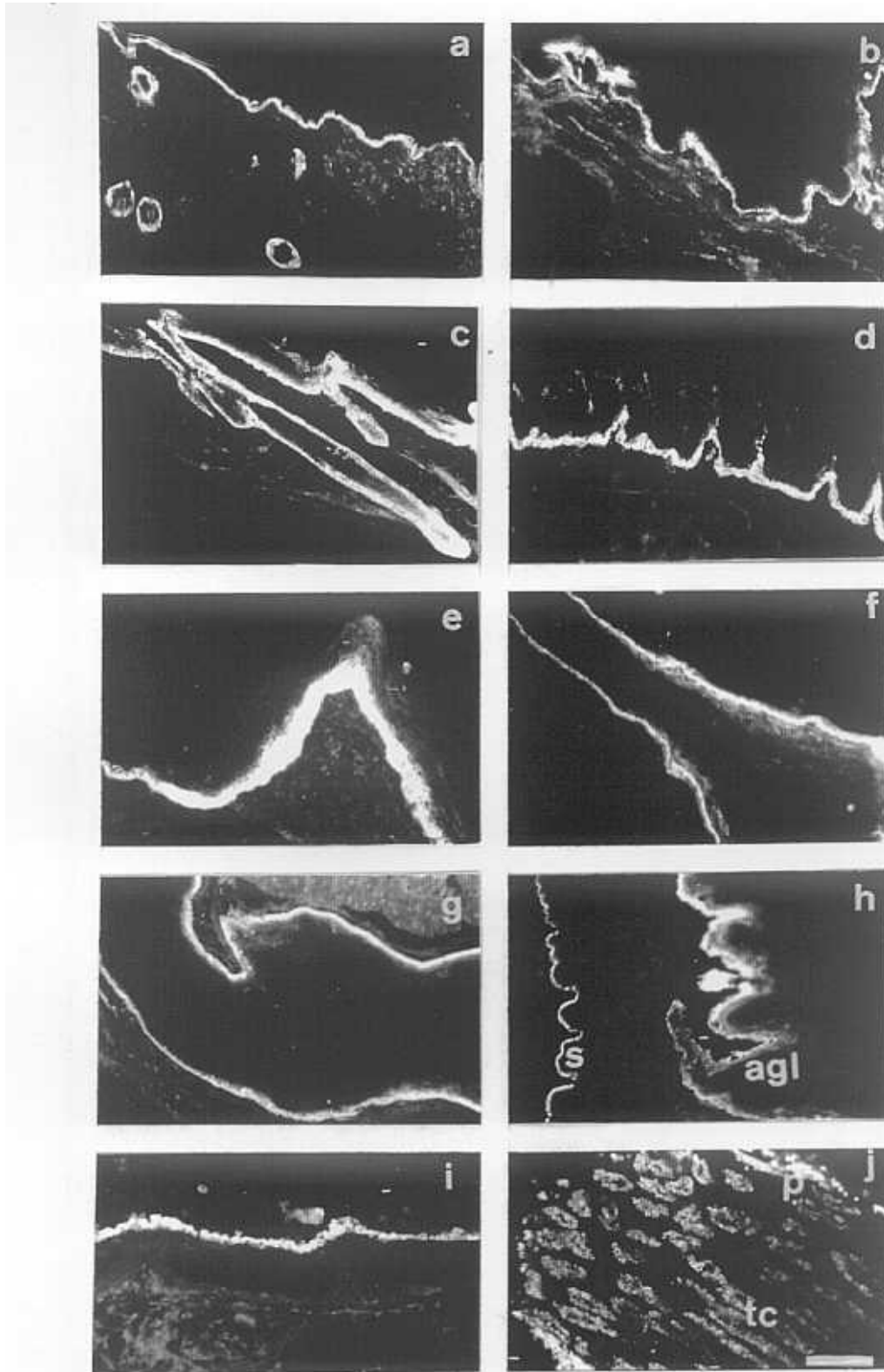


Figura 8. Expresión de la proteína transgénica hK10 en ratones transgénicos bK5-hK10 (expresión coincidente con mK5). Detección por inmunofluorescencia de la proteína hK10 en piel del lomo (a), epitelio plantar (b), piel de la cola (c), lengua (d), paladar (e), epitelio nasal (f), esófago (g), estómago aglandular (agl) y serosa (s) (h), tráquea (i), riñón (j). Obsérvese en el riñón expresión en pelvis renal (p) y tubos colectores (tc). a, b, c, f, g, línea 821; d línea 825; e, j línea 1227; h, i, línea 1213. d y g con el anticuerpo monoclonal RKSE60, el resto con el anticuerpo monoclonal AE2. Barra, 30 μ m.

1.3.2. Expresión genuinamente ectópica

El análisis de expresión del transgén bK5-hK10 es, en general, bastante coincidente con el de mK5 (tabla III, figura 8); sin embargo varios tejidos reaccionaron con el anticuerpo monoclonal AE2 (reconoce de forma específica hK10), sin detectarse en ellos queratina K5 murina. Este patrón sorprendente de expresión no coincidente sólo se observaba en las líneas que integraban mayor número de copias, que, a su vez, eran las que manifestaban alteraciones fenotípicas. La tabla IV recoge un resumen de estos patrones de expresión inesperados en las distintas líneas.

TEJIDO	LÍNEA					
	665 ^a	825 ^a	821 ^a	1213 ^a	1227 ^a	mK5
estómago glandular	-	-	+	++	++ ¹	-
hígado	-	-	+ ²	++ ²	++ ^{2,3}	-
pulmón	-	-	+ ⁴	+++ ⁴	+++ ⁴	-
cerebro	-	NA	NA	+++ ⁵	+++ ⁵	-
páncreas	NA	NA	NA	++ ^{6,7}	++ ⁶	-
tiroides	NA	NA	NA	++	++	-

Tabla IV. Resumen de la expresión del transgén hK10 y de la queratina endógena mK5 en ratones transgénicos bK5-hK10 (hK10 y mK5) y controles (mK5). Detección por inmunofluorescencia de hK10 y mK5 con los anticuerpos AE2 y RK5, respectivamente. a: intensidad de tinción percibida por inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal AE2, 1: expresión también en serosa (que es negativa para mK5), 2: epitelios de los conductos biliares extralobulillares, 3: epitelio y serosa de la vesícula biliar, 4: sólo alveolos, 5: plexos coroideos, 6: conductos de secreción, 7: células secretoras.

La figura 9, muestra una serie de tejidos representativos de no coincidencia entre la proteína transgénica (K10), y la proteína endógena codificada por el gen homólogo del promotor (mK5). No parece que en ninguno de los casos observados la expresión del transgén sea debida a efecto de posición, reflejando los efectos de algún posible elemento actuando en *cis* en el sitio de integración; más bien al contrario, la reproducibilidad de los datos de expresión para la mayoría de líneas y tejidos indica que esta expresión sea independiente del sitio de integración.

Estos datos indican que, en los epitelios de ratones transgénicos adultos con un número reducido de copias del transgén, el gen de la queratina humana hK10 bajo el control de bK5 se regula fundamentalmente de forma específica celular y de tejido. Por el contrario, en los ratones que han integrado un número mayor de copias del transgén, la expresión de la proteína

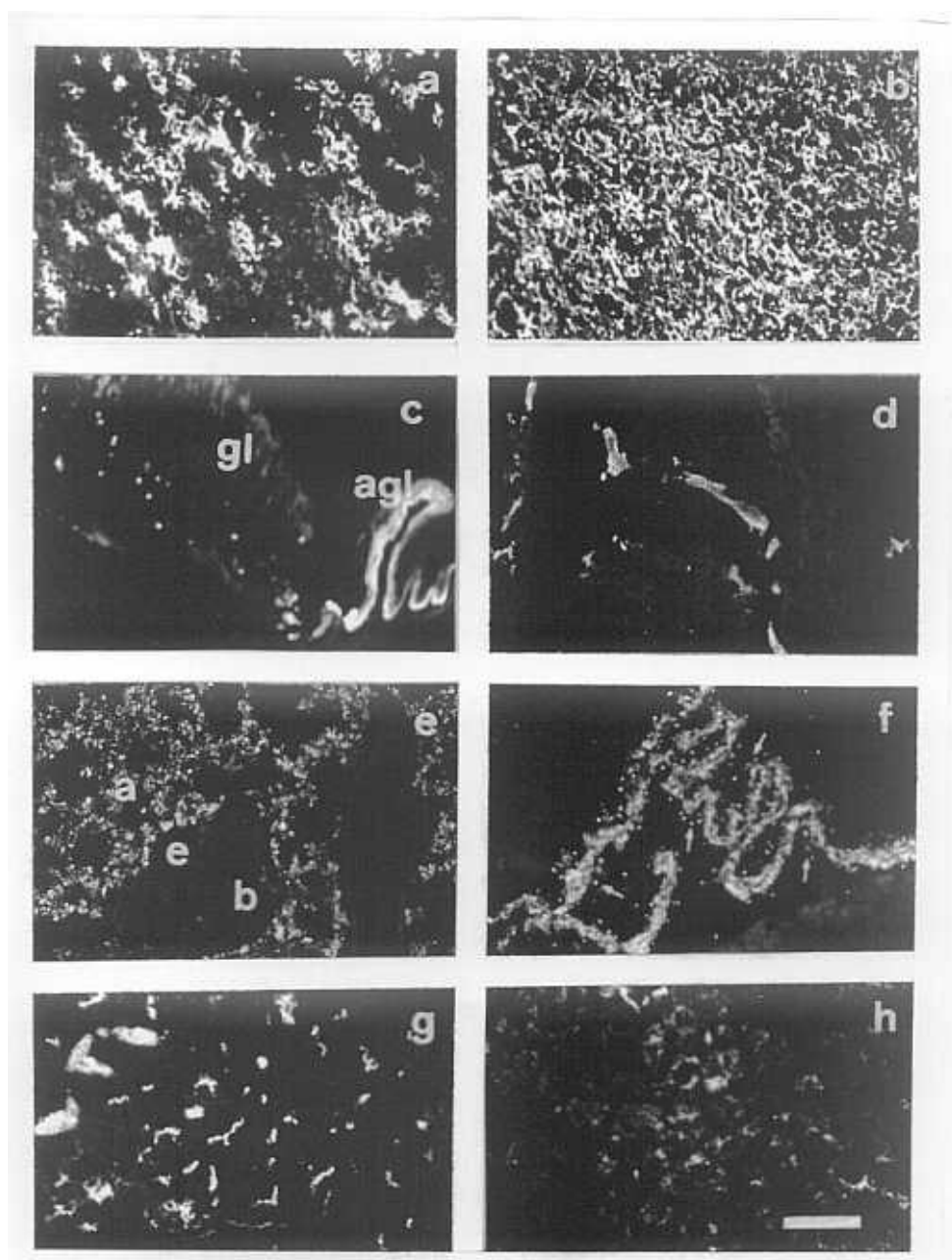


Figura 9. Inmunolocalización de la proteína transgénica hK10 en ratones transgénicos bk5-hK10 de las líneas 1213, 1227 (expresión no coincidente con mK5). **a)** y **b)** muestra una doble inmunofluorescencia de timo de la línea 1227: **a)** teñido con RK5 (expresión endógena) y **b)** con AE2 (expresión transgénica). El resto, detección por inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal AE2 en criosecciones de estómago (aglandular, agl y glandular, gl) (**c**), hígado (**d**), pulmón (**e**), plexos coroideos (**f**), páncreas (**g**), tiroides (**h**). Obsérvese la expresión en gránulos en los plexos coroideos (flechas); en pulmón hay expresión del transgén en los alveolos (**a**), pero no en bronquiolos (**b**) ni endotelio vascular (**e**). **a, b, c, d, f, g,** línea 1227; **e, h,** línea 1213. Barra, 30 μ m (**a-e**); 18 μ m (**f-h**).

transgénica se visualiza de forma inesperada en células y tejidos en los que no se detecta la K5 endógena. Una situación similar, en la que se ha observado expresión inadecuada del transgén proporcional al número de copias integrado, se ha descrito para las queratinas hK16 (Takahashi y cols. 1994) y hK8 (Casanova y cols. 1995).

Cuando se observa la proteína transgénica a grandes aumentos al microscopio, tanto en los tejidos en los que hK10 y mK5 coinciden, como en los que se detecta expresión genuinamente ectópica del transgén, se aprecian formaciones con aspecto de filamentos, por lo que presumiblemente la queratina humana ha formado estructuras filamentosas con alguna queratina endógena. Esto no se cumple para todos los órganos, ya que en las células secretoras de las glándulas salivales de la línea 1227, y en las líneas en que se ha observado expresión ectópica en los plexos coroideos, se observa el transgén en forma de gránulos (figura 9f), lo que podría deberse a un exceso de queratina transgénica, en relación a las queratinas endógenas de tipo II, produciendo una agregación de proteína que interfiere con la organización normal del citoesqueleto.

De los tejidos donde se expresa K10 (tinción con AE2) no coincidente con K5, se observa colocalización con K8 (tinción con TROMA 1) en estómago glandular, hígado, pulmón, y los tubos colectores del riñón, todos ellos epitelios simples, sugiriendo que ambas queratinas copolimerizan en un único citoesqueleto formando filamentos (no mostrado).

Se ha analizado la expresión de otras queratinas endógenas (K14, K1, K10, K6) por inmunofluorescencias indirectas en epidermis (piel de lomo, cola y plantar) y epitelios internos (lengua, paladar, esófago y epitelio nasal), encontrándose un patrón de expresión normal para estas proteínas en criosecciones de animales transgénicos (resultados no mostrados). Esto demuestra que la expresión del transgén no parece interferir con las queratinas endógenas.

La expresión detectada mediante inmunofluorescencias indirectas de la loricrina, componente esencial en la fase de maduración del epitelio, se localiza en capas inmediatamente superiores a la capa basal que expresa el transgén.

1.3.3. Expresión proporcional al número de copias

Aunque la tinción por inmunofluorescencia no es un método cuantitativo, sí es posible apreciar una tinción diferencial, más o menos intensa, en las distintas líneas de animales transgénicos; en las tablas III y IV se representan por símbolos que en orden creciente de intensidad percibida van de + a +++. De los datos resumidos en las tablas III y IV se

infiere que, por esta aproximación no cuantitativa, en las líneas 1213 y 1227 se observa una mayor expresión del transgén que en las líneas 665 y 825. Precisamente las líneas 1213 y 1227 integran un número elevado de copias del transgén y manifiestan alteraciones fenotípicas, mientras que las líneas 665 y 825 son las que integran el menor número de copias (en torno a 5 copias por célula) y no manifiestan alteraciones fenotípicas. Cabría esperar una correlación entre el número de copias integrado, los niveles de expresión y la severidad fenotípica.

Para confirmar esta hipótesis se realizó el análisis de la expresión del transgén por ARNm en pieles de cola de todas las líneas transgénicas y se cuantificaron los niveles de ARNm mediante densitometría del *Northern blot*.

La figura 10 muestra la expresión de ARNm del transgén en el *Northern blot*; se observa que los animales con mayor número de copias del transgén son también los que presentan mayor expresión de ARN de hK10. Las sondas que se utilizaron fueron: un fragmento ClaI del extremo 5' del gen de hK10 para detectar la expresión del transgén y β -actina como control de carga, para conocer la cantidad de ARN que realmente hay en cada pocillo. Esta figura, y la tabla V ponen de manifiesto que existe una correlación entre número de copias, niveles de expresión y efecto fenotípico.

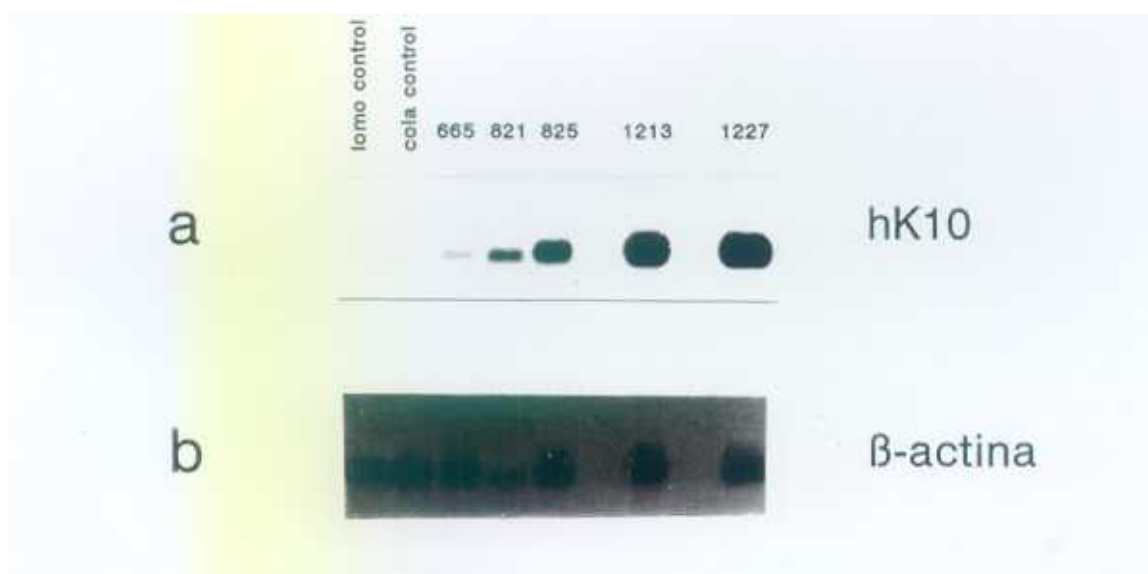


Figura 10. Análisis por *Northern blot* de la expresión del transgén en diferentes líneas de ratones transgénicos bK5-hK10 a) Se corrieron 7 μ g de ARN de piel de la cola de animales transgénicos de la línea arriba indicada, y piel de lomo y piel de la cola de un ratón control y se hibridaron con un fragmento ClaI de 600 pb del extremo 5' del gen de hK10 que reconoce de forma específica la queratina K10 humana; b) El mismo filtro hibridado con β -actina, como control de carga.

La tabla V recoge los valores obtenidos de la densitometría del *Northern blot* del ARN aislado de piel de la cola de las diferentes líneas

	línea 665	línea 825	línea 821	línea 1213	línea 1227
hK10	0.7	2.8	5.2	7.01	9.3

Tabla V. Valores de densitometría (en unidades arbitrarias) de la expresión de ARN de la piel de la cola de las líneas transgénicas 665, 825, 821, 1213, 1227. Los datos están normalizados por el valor de β -actina. En ambas hibridaciones se ha utilizado el mismo filtro.

Estos valores coinciden con las intensidades relativas de expresión observadas por inmunofluorescencias indirectas (tabla III), salvo la línea 825, para la que quizá se hubiera esperado un valor menor.

1.4. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE K10 EN CAPAS BASALES: ALTERACIONES FENOTÍPICAS PRODUCIDAS EN LÍNEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS bK5-hK10

Las líneas 665 y 825 no presentan alteraciones fenotípicas, ni características morfológicas que las distingan de sus hermanos no transgénicos, son ratones sanos con una duración media de vida normal. Estas líneas son las que han integrado un número bajo de copias, presentan niveles menores de expresión del transgén y en ellas no se ha detectado expresión del transgén en ningún tejido no coincidente con mK5.

La característica fenotípica más llamativa de los ratones de las líneas 821, 1213 y 1227 es su pequeño tamaño: el crecimiento de estos ratones transgénicos es muy similar al de sus hermanos de camada durante las tres primeras semanas de vida, a partir de este momento las curvas de crecimiento divergen (de forma más acentuada para los machos), ya que apenas se observa un aumento de peso en los ratones transgénicos, que alcanzan como máximo un 50% del peso al que llegan sus hermanos no transgénicos (figuras 11a y 12). Además, estos animales manifiestan un temblor fino, que se agudiza si se les somete a estrés, se observa una paresia que afecta a las extremidades posteriores (figura 11b), y presentan una viabilidad muy reducida: las hembras de la línea 1227 que son las más longevas no superan en ningún caso el tercer mes de vida (figura 12a). Estas diferencias morfológicas externas se empiezan a manifestar a partir de la tercera o cuarta semana de vida. Esta edad es significativa para el



Figura 11. Ratones transgénicos bK5-hK10 de las líneas 1213 (a) y 1227 (b). (a): ratones de la misma camada, transgénico (izquierda), y no transgénico (derecha); obsérvese en (b) la paresia en las extremidades posteriores.



Figura 12 a): Representación, por sexos de los pesos de las camadas de los ratones hijos del fundador 1227 transgénicos (TG) y sus hermanos de camada (NT). Se han pesado los ratones desde el segundo día de vida hasta las 18 semanas. Cada punto de la curva representa la media entre 16-26 no transgénicos y 3-13 transgénicos.



Figura 12 b): Evolución del peso en ratones transgénicos (TG) y sus hermanos de camada (NT), representados por sexos, de la línea 1213. Se pesaron 7 camadas desde el segundo día de vida. Cada punto representa la media entre 6-23 no transgénicos y 3-7 transgénicos.

desarrollo del ratón ya que en este momento se produce el destete de los animales, cambiando de alimentación, también es el momento de la mielinización, y el momento en que el timo finaliza su crecimiento.

El análisis histológico de los órganos de estos animales reveló serias alteraciones en algunos de ellos, que se detallan a continuación:

Alteraciones en epidermis:

En la piel de los animales de las líneas **1213** y **1227** existe una marcada hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo) ortoqueratótica. El aumento excesivo del estrato córneo acelular se asocia con una atrofia del resto de los estratos celulares de tal forma que la epidermis, con 2 ó 3 capas de células habitualmente en el ratón (figura 13 a y c), se transforma en los transgénicos en una única capa, constituida por células muy aplanadas, incluso endoteliformes, de núcleo muy picnótico, unas veces perpendicular y otras paralelo a la membrana basal (figura 13 b y d). Además, la piel muestra una papilomatosis difusa por protusión de las papilas dérmicas hacia la superficie, provocando una ondulación irregular y muy marcada de la epidermis (figura 13 b y d).

En la figura 13 (a y b) se observan además los folículos pilosos en fase de telogén, tanto en los controles como en los transgénicos pero, en estos últimos se evidencia también una atrofia de la vaina radicular externa, con células de núcleos picnóticos, arrugados y de pequeño tamaño (figura 13a control, y 13b transgénico). Sin embargo, aunque no se ha realizado un estudio detallado, no se han observado alteraciones ni en la apariencia ni en el crecimiento del pelo.

En uno de los transgénicos analizados de la línea **1213**, con un mes de edad, se observaron múltiples costras blanquecinas, duras, haciendo prominencia y con una distribución simétrica en el cuello, mejillas, flancos, dorso y región perineal. Microscópicamente, la epidermis, que no mostraba lesiones macroscópicas, presentaba las características ya descritas para los transgénicos, mientras que las regiones correspondientes a las costras se caracterizaban por la presencia de una dermatitis intersticial asociada a una hiperplasia irregular del epitelio: por un lado existían proyecciones digitiformes de hiperqueratosis, con una marcada hiperqueratosis ortoqueratótica y formación de múltiples tapones de queratina bloqueando la apertura de los folículos pilosos (figura 13f) y, por otro lado, una hiperplasia epidérmica psoriasiforme, con un epitelio acantósico (con el estrato espinoso engrosado), hiperqueratótico y con hipergranulosis, múltiples folículos pilosos displásicos, sin pelo ni diferenciación de glándulas sebáceas, además de una acantolisis difusa

intrabasal (figura 13e).

Alteraciones en epitelios internos:

En el estómago de todos los transgénicos existe hiperqueratosis ortoqueratótica, de moderada a intensa, en el epitelio plano estratificado queratinizado de la porción aglandular (figura 13i). Además del aumento claro en el espesor de la capa córnea acelular, en muchos casos se observa un estrato lúcido muy evidente, homogéneo y eosinófilo (figura 13h), en comparación con los controles (figura 13g). Estos estratos lúcidos ensanchados, muy eosinófilos, se observan además en el esófago (figura 13k), más característicos en los transgénicos de la línea 1213. A pesar de la presencia de la hiperqueratosis, estos epitelios no presentan las profundas alteraciones de las capas de células vivas observadas en la piel del lomo.

Del conjunto de estos datos se concluye que tanto en algunos de los epitelios internos estratificados, como en la piel del lomo (que expresan la queratina K10 transgénica en las capas basales (figura 8), se produce un fuerte aumento de los estratos de la epidermis característicos de la diferenciación terminal (estrato córneo), o estratos característicos de los epitelios en áreas muy queratinizadas como la planta del pie (estrato lúcido), lo que sugiere, unido a los datos aportados por la ultraestructura que se detallarán más adelante, una diferenciación anómala, con un tránsito muy rápido de la célula basal, que expresa K10 transgénica, a las capas diferenciadas de epitelios.

Se han observado además, alteraciones en otros órganos internos, no encontrándose siempre una correlación directa entre la expresión del transgén y la lesión observada. Cabe destacar las siguientes alteraciones histopatológicas:

Alteraciones en otros órganos:

Las orejas de muchos de los transgénicos analizados, (pertenecientes a las líneas 1213 y 1227), presentan de forma progresiva gangrena seca de las porciones distales de ambas orejas, con la consecuente pérdida de estas porciones y su posterior cicatrización. Al estudiar microscópicamente los pabellones auriculares, se observa la presencia de un tejido conjuntivo joven en el extremo distal, apenas cubierto de epitelio, así como de múltiples trombos en fase regenerativa, afectando a los capilares terminales (figura 14h). La gangrena seca como consecuencia de una trombosis múltiple en la circulación terminal de órganos distales puede tener su origen en vasoconstricción sostenida, lesiones del endotelio vascular, coagulación

intravascular diseminada, estasis sanguíneo o infección sistémica que lesionan el endotelio vascular.

En el **páncreas** de los transgénicos analizados (de las dos líneas) existe una gran hipertrofia de los acinos pancreáticos que circundan a los islotes de Langerhans, presentando el resto del páncreas un aspecto histológico normal (figura 14a, b). En los acinos hipertrofiados que rodean a los islotes, el núcleo aparece desplazado periféricamente hacia la membrana basal; y el citoplasma está muy dilatado y acidófilo por la presencia de gran cantidad de gránulos de zimógeno. Como se ha descrito anteriormente, se observa expresión genuinamente ectópica de filamentos de hK10 en las células acinares y pequeños conductos. Planteamos la hipótesis de que esta hipertrofia limitada a las regiones alrededor de los islotes podría deberse a una hiperactividad inducida por la expresión del transgén hK10, que se manifiesta morfológicamente en la región mejor vascularizada del páncreas que limita a los islotes.

Referente al **sistema nervioso** destacamos las siguientes alteraciones en las dos líneas: en los adultos transgénicos analizados, existe una despoblación de neuronas motoras en el asta anterior de la médula espinal. Esta despoblación se debe a un proceso de atrofia de neuronas y posterior fagocitosis de las mismas por parte de las células de microglía. La atrofia neuronal se caracteriza por la presencia de cuerpos celulares arrugados, (teñidos de forma basófila difusa), con pérdida de los detalles intracelulares. Se observa también una intensa vacuolización de las neuronas motoras y células de neuroglía en la sustancia gris de la médula espinal, caracterizada por la presencia de múltiples vesículas, intracitoplasmáticas, que dan un aspecto esponjoso a la sustancia gris (figura 14d). No se ha observado expresión del transgén en estos tipos celulares.

Los **plexos coroideos** de los transgénicos, muestran una atrofia en las células que los constituyen, con núcleo pequeño y citoplasma intensamente eosinófilo y muy escaso (figura 14f) que los diferencian de sus hermanos no transgénicos (figura 14e). Los plexos coroideos producen el líquido cefalorraquídeo, que baña todo el sistema nervioso central, y se encargan de su constante renovación. Se ha mencionado la expresión inesperada de la queratina transgénica en forma de gránulos en los plexos coroideos (figura 9f); es posible que la presencia anómala de esta proteína impida el desarrollo normal de las células epiteliales que componen los plexos coroideos pudiendo alterar su normal funcionamiento. Las fibras nerviosas del **nervio ciático** presentan tumefacción de la vaina de mielina de forma segmentaria entre los nódulos de Ranvier. Este proceso degenerativo puede ser consecuente a procesos degenerativos y muerte del cuerpo neuronal presente en las astas anteriores de la médula espinal (figura 14g).

En cortes transversales de los **músculos de las extremidades posteriores** se observan paquetes completos de fibras musculares esqueléticas atroficas, con citoplasma escaso, y de forma irregular, angulosa (figura 14j). Probablemente la atrofia sea debida a la inactividad del músculo originada por la deficiente innervación motora debida a los trastornos ya descritos en el nervio ciático manifestándose clínicamente en forma de parálisis parcial en las extremidades posteriores de los ratones transgénicos de las líneas **1213 y 1227**.

Algunos de los transgénicos muertos espontáneamente presentaron un cuadro de encefalitis purulenta, asociado a una depleción de linfocitos en la región cortical del **timo** (figura 14l), sugiriendo un proceso de inmunodeficiencia. Para su confirmación se llevó a cabo un análisis mediante citometría de flujo y determinación de la fórmula leucocitaria, en otros hermanos transgénicos vivos, para determinar las poblaciones de linfocitos T y B en sangre periférica, obteniéndose como resultado una linfocitopenia para ambas poblaciones, revelando un estado de inmunodeficiencia muy evidente en estos animales. Dado que en el timo se produce la maduración de los linfocitos T, no podemos descartar el hecho de que la presencia anómala de queratina K10 humana en las células epiteliales corticales de este órgano esté implicada en la depleción linfocitaria tímica y en la linfocitopenia en sangre periférica observadas en estos animales transgénicos. Este estado de inmunodeficiencia hace que sean muy susceptibles a infecciones por agentes externos y les cause la muerte a edades tempranas.

En algunos epitelios simples (estómago glandular, hígado, pulmón, riñón), la queratina K10 transgénica se integra en el citoesqueleto formando filamentos con la queratina K8 endógena, sin presentar alteraciones histológicas, ni indicios que hagan sospechar una disfunción hepática, respiratoria o renal. Blessing y cols. (1993) detectaron en animales transgénicos colocalización de la queratina humana hK10 con la endógena mK8 en estructuras fibrilares del páncreas de ratones transgénicos, sin que la fisiología normal del páncreas se viera alterada.

A pesar de las variaciones en la severidad fenotípica individual, resultados esencialmente idénticos se obtuvieron para las dos líneas de la construcción bK5-hK10 que integraron un número elevado de copias y se pudieron analizar, lo que demuestra que los fenotipos observados son consecuencia directa de la expresión del transgén.

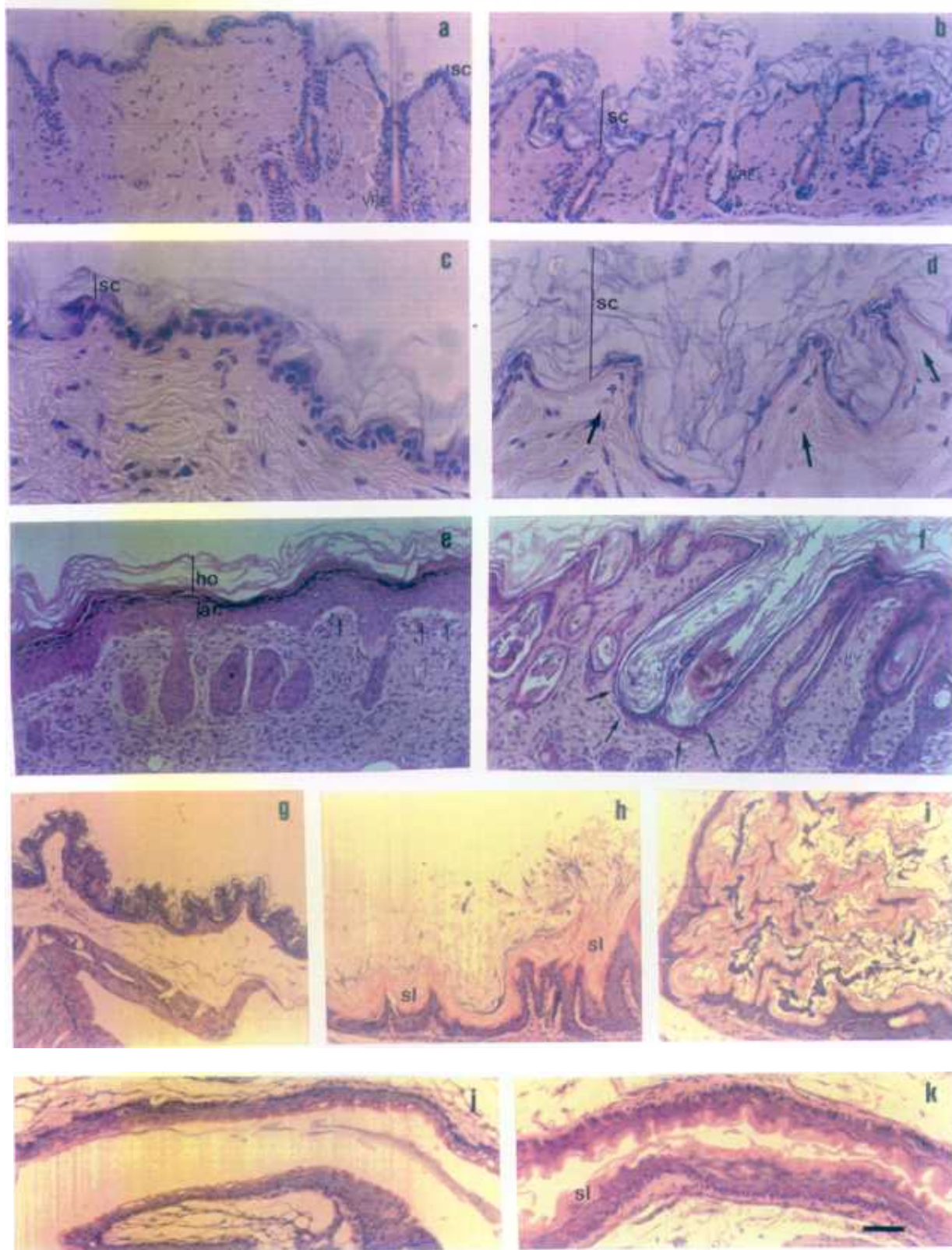


Figura 13. Alteraciones morfológicas de órganos de ratones transgénicos de las líneas 1213 y 1227. Figuras representativas de piel lomo (a, c, control; b, d, transgénico; las flechas en d) indican la papilomatosis), hiperplasia epidérmica psoriasiforme en uno de los animales transgénicos (e; las flechas señalan la acantosis), proyecciones de hiperqueratosis con tapones de queratina (flechas) bloqueando el folículo (f), estómago (g, control; h, i, transgénico), esófago (j, control; k, transgénico). SC: estrato córneo; SL: estrato lúcido; VRE: vaina radicular externa. HO: hiperqueratosis ortoqueratótica, AC: acantosis a-d, línea 1227; e-k, línea 1213. Barra c,d 33 μ m; el resto 13 μ m.

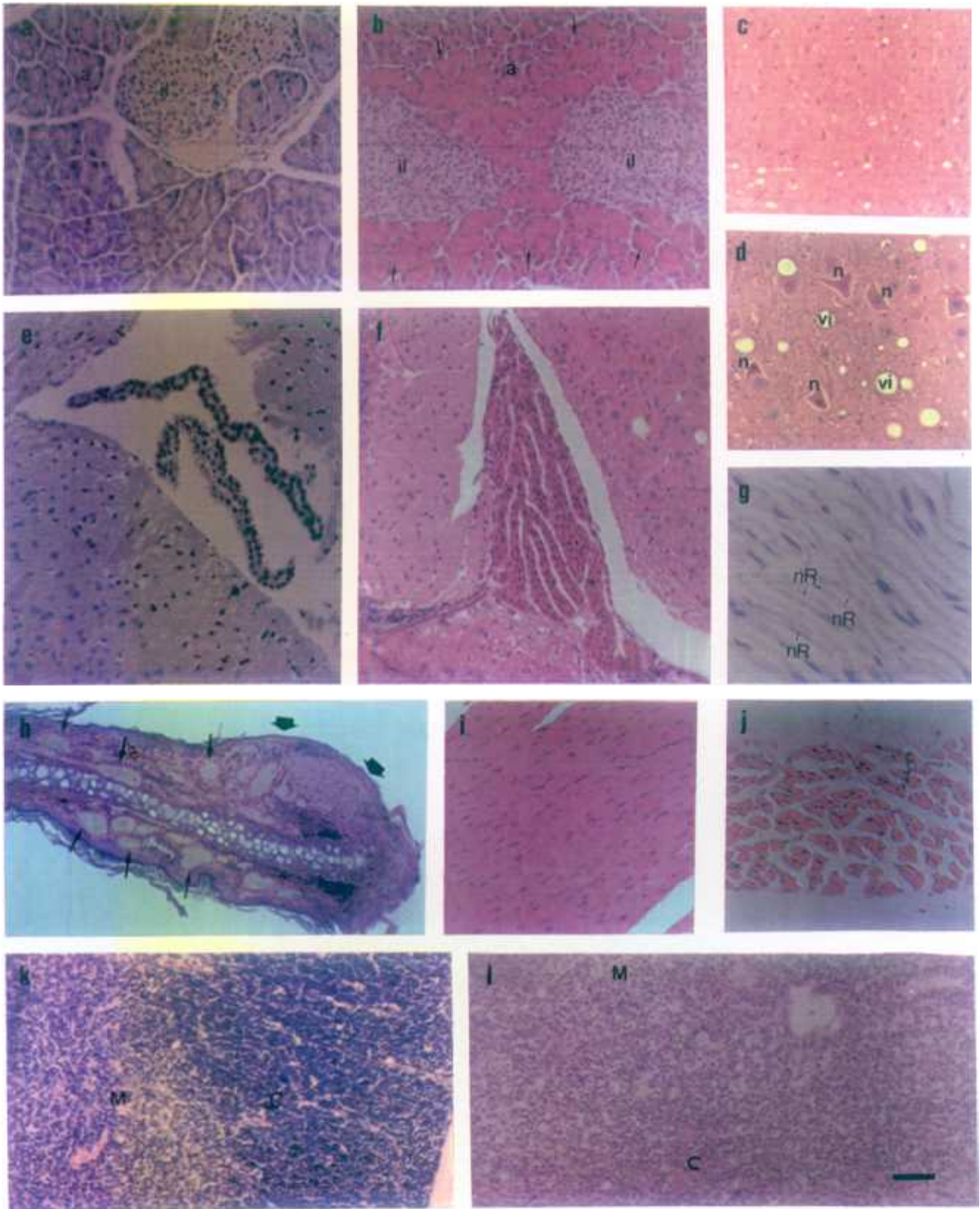


Figura 14. Alteraciones morfológicas en órganos de ratones transgénicos de las líneas 1213 y 1227. Figuras representativas de páncreas (a y b, las flechas en b, señalan los adenómeros hipertrofiados con células cargadas de gránulos de zimógeno), médula espinal (c y d), plexos coroideos (e y f), nervio ciático (g), oreja (h, las flechas señalan los trombos en fase regenerativa, las flechas gruesas el tejido conjuntivo joven), sección transversal del músculo de las extremidades posteriores (i y j), timo (k y l, nótese la ausencia de linfocitos en l). a:adenómeros, il: islotes de Langerhans, n:neuronas degeneradas, vi: vesículas intracitoplasmáticas, nR: nódulo de Ranvier, M:médula, C:corteza. a,b, c-e, i-l: línea 1213; c,d,h: línea 1227. a, c, e, i, k, corresponden a órganos controles. Barra, g 33µm; h 13 µm,; el resto 20µm.

1.4.1. Ultraestructura

Dadas las características fenotípicas tan peculiares observadas en el estudio histológico, se llevó a cabo un estudio ultraestructural de la piel del lomo en las líneas 1213 y 1227:

En los cortes ultrafinos de la piel de los ratones transgénicos, observamos la epidermis constituida por una capa y media de células que mostraban un marcado polimorfismo nuclear, con núcleos redondeados, otros irregulares, alargados..., y de diferente tamaño (figura 15a). Las células basales presentaban tumefacción de las mitocondrias con desorganización de las crestas mitocondriales, abundantes ribosomas libres y haces de filamentos de queratina dispuestos entre los organoides citoplasmáticos, y también anclados en los desmosomas y hemidesmosomas presentes en la superficie de la membrana plasmática (figura 15b). Sobre las células basales se observaban, de forma aislada, células muy aplanadas con citoplasma electrodenso, a modo de placa discontinua, sobre la cual se evidenciaba el estrato córneo muy abundante, en el que ya se han perdido las uniones intercelulares (figura 15a). Destacó la ausencia de gránulos de queratohialina electrodensos en las porciones citoplasmáticas de las células suprabasales que se podían observar bajo el estrato córneo (figura 15a).

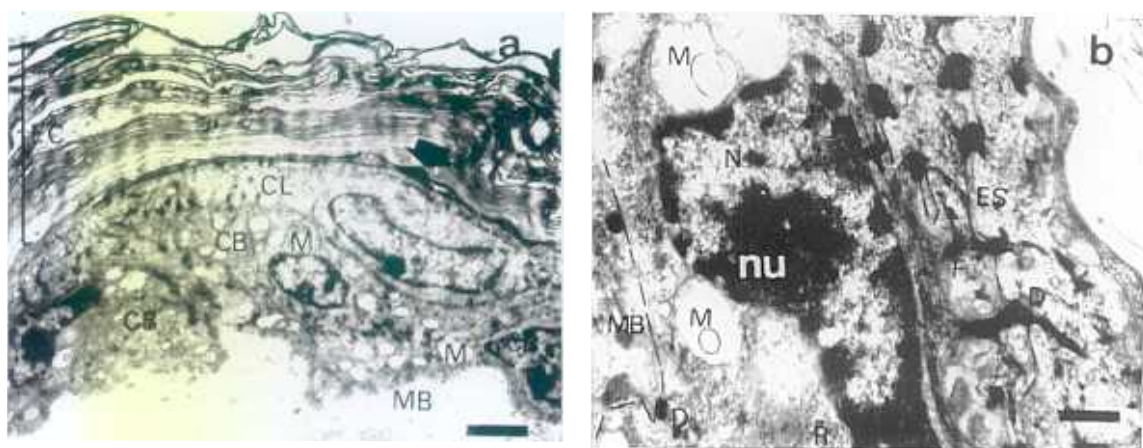


Figura 15. Microscopía electrónica de la piel del lomo en transgénicos de la línea 1227: epidermis (a) y detalle de las células basales, filamentos y desmosomas (b). CB: célula basal, CL: célula de Langerhans, EC: estrato córneo, D: desmosoma, F: tonofilamento, R: ribosoma, M: mitocondria, N: núcleo, NU: nucleolo, MB: membrana basal. La flecha en a) señala una célula aplanada sin gránulos de queratohialina. Las líneas discontinuas en b) señalan la membrana basal (MB) y el espacio intercelular (ES). Barra, 2 μ m (a); 500nm (b).

La falta de estrato granuloso sorprende, a la vista de un bien desarrollado estrato córneo ortoqueratótico, para el que se supone necesaria la existencia de un estrato granuloso en el que la filagrina se encuentra agregada con los tonofilamentos en los característicos gránulos de queratohialina. La transición de las células basales hacia el estrato córneo superficial característico de un epitelio plano estratificado queratinizado en su última fase de diferenciación, sin apenas existir estados celulares intermedios en el proceso de queratinización (no se observa estrato granuloso), indica que el proceso de diferenciación de estas células es anómalo, y que esta diferenciación específica de la epidermis se está produciendo de forma muy acelerada.

1.4.2. Análisis de la actividad mitótica

Dadas las alteraciones observadas en diferentes epitelios de los animales transgénicos, se analizó su capacidad de proliferar a través de experimentos de incorporación de BrdU.

Ratones transgénicos de las líneas 665, 825, 1213 y 1227 fueron inyectados via intraperitoneal con BrdU, y una hora después se tomaron muestras de los mismos. En el caso de las líneas 1213 y 1227, se realizó el mismo análisis a hermanos no transgénicos de la misma camada y jaula, siendo por tanto de la misma edad y llevando igual alimentación. Para estas líneas se tomaron muestras de piel de lomo sin tratar, y tratada con TPA (conocido estimulador de la actividad mitótica de la epidermis), estómago aglandular y lengua.

Las secciones histológicas se analizaron por dobles inmunofluorescencias indirectas, usando un anticuerpo anti-BrdU (amablemente cedido por S. Mittnatch) y AE2 (figura 16). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla VI :

	TG 1213	NT 1213	TG 1227	NT 1227	TG 825	TG 665
piel	12.7%	6.1%	10.1%	4.8%	NA	NA
piel TPA	22.8%	12.3%	18.1%	14.3%	17.6%	16.7%
estómago	31.5%	17%	27.7%	17.3%	NA	NA
lengua	10.9%	12.6%	10%	10.9%	NA	NA

Tabla VI. Incorporación de BrdU en las capas basales de diferentes órganos de ratones transgénicos y hermanos de camada controles. NA: no analizado. Los porcentajes se refieren al número de células basales positivas con el anticuerpo anti-BrdU.

Los resultados demuestran que, aunque la expresión de K10 pueda ser un resultado de la pérdida de capacidad proliferativa en las células suprabasales de epitelios estratificados, no inhibe la proliferación al menos en/o por sí misma. Se observa un aumento en la incorporación de BrdU, y por consiguiente en la actividad mitótica de las células basales, en los tejidos en los que se manifiesta un fenotipo de hiperqueratosis (piel y estómago de los animales transgénicos de las líneas 1213 y 1227) lo que puede ser un indicio de un aumento en el grado de proliferación de las células basales en los tejidos con hiperqueratosis.

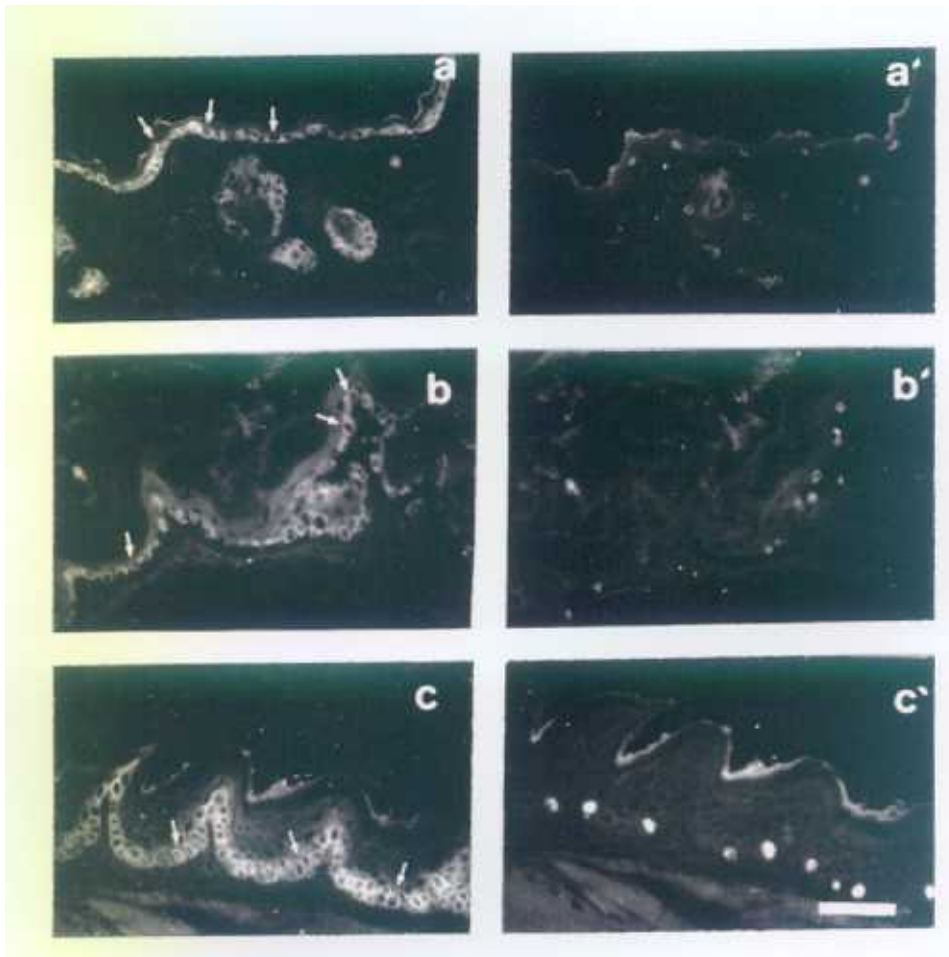


Figura 16. Análisis de la actividad mitótica. Se realizaron dobles inmunofluorescencias en secciones de piel (a y a'), estómago (b y b') y lengua (c y c') de ratones transgénicos bK5-hK10 con el anticuerpo AE2 (a, b y c) y anti-BrdU (a', b' y c'). a y c línea 1213; b, línea 1227. Barra, 30 μ m. Las flechas indican las células que están incorporando BrdU.

1.5. NO SE DETECTA EXPRESIÓN DE K1 EN NINGUNA DE LAS LÍNEAS PORTADORAS DEL TRANSGÉN bK5-hK1

De forma similar al análisis de expresión de los transgenes bK5-hK10, se analizó la localización de la proteína transgénica en tejidos de los animales transgénicos portadores de la construcción bK5-hK1 por inmunofluorescencias indirectas con anticuerpos específicos, en criosecciones de diferentes órganos de todas las líneas de animales transgénicos.

No se detectó expresión de la proteína transgénica en ninguna de las líneas (no mostrado). Todas ellas se analizaron utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales que reconocen hK1: KA5, EAB904, AE2, k_{8.60}, y el anticuerpo policlonal RK1 (amablemente cedido por el Dr. Roop). Algunos de estos anticuerpos no son específicos de la(s) queratina(s) humanas K1 (y K10, según el caso), sino que reaccionan también con las queratinas K1 (y K10) murinas; tal es el caso de K_{8.60} y RK1. Sin embargo, al esperar la localización de la K1 transgénica principalmente en las capas basales de epidermis, hubiera sido posible su detección, en caso de que ésta se expresara, también con estos anticuerpos. Otros autores han detectado la expresión de hK1 con los anticuerpos monoclonales EAB904, y k_{8.60} en tejidos de ratones transgénicos (Blessing y cols. 1993), portadores del mismo clon genómico de hK1 que se ha utilizado en este trabajo. Además, la presencia de hK1 ha sido detectada en células BMGE+H y MCA3D transfectadas con este mismo transgén (figura 5b), usando anticuerpos, y, por otro lado, todos los anticuerpos usados para detectar la queratina humana reaccionaron positivamente en cortes de epidermis humana usados como control (no mostrado).

Para evitar un reconocimiento inespecífico de los anticuerpos por reaccionar con la(s) queratina(s) K1 (y K10) endógenas en tejidos de ratón, o un posible problema de detección del transgén porque los niveles de expresión del mismo fueran muy bajos, incluso por debajo del límite de detección por inmunofluorescencia, se realizaron cultivos primarios de queratinocitos de piel de lomo de ratones transgénicos recién nacidos de las líneas **868**, **871** y **878**, no detectándose en ninguno de ellos la presencia del transgén, ni en tinciones por inmunofluorescencia, ni por inmunoperoxidasas, utilizando diaminobenzidina como cromógeno (no mostrado).

Por todas las razones anteriormente citadas, se concluye que la queratina transgénica hK1 no se expresa en ninguna de las líneas transgénicas obtenidas.

1.6. LETALIDAD EN LOS RATONES bK5-hK10 Y bK5-hK1. ANÁLISIS DE EMBRIONES PORTADORES DEL TRANSGÉN bK5-hK10

Lo más llamativo al recopilar los datos de la generación de ratones transgénicos con

las construcciones bK5-hK10 y bK5-hK1 (tabla VII) es la baja eficacia de obtención de los mismos: un 2.3% de los ratones adultos nacidos de microinyección con el ADN de bK5-hK10 eran transgénicos y un 2.7% de los nacidos de la microinyección con bK5-hK1, ambas cifras muy inferiores al 10-15% esperable en general para cualquier transgén neutro. Se hicieron controles con los factores que se sabe afectan a la integración del transgén: concentración del ADN a inyectar, linearización del transgén separándolo de las secuencias plasmídicas bacterianas mediante enzimas que realizan cortes romos y protuberantes, diferentes métodos de purificación del ADN a inyectar... (Brinster y cols. 1986) sin conseguir mejorar estas cifras.

En cuanto a los animales nacidos se refiere, los fundadores de las líneas **821**, **1213** y **1227** son mosaicos de células normales y transgénicas; ellos no presentan ningún fenotipo mientras que toda su progenie transgénica sí lo manifiesta. La transmisión del transgén a la descendencia es inferior al 50%, especialmente para la línea **1213**, con una transmisión del 16%, mientras que en el caso de la línea **1227** un 29% de la descendencia hereda el transgén; sólo se tuvo una camada de la fundadora **821**, con 3 animales transgénicos de un total de 7 nacidos. El fenotipo de estas líneas es severo: escasa viabilidad para los transgénicos, con algunos animales fértiles, pero incapaces de dar descendencia. En el caso de los transgenes de K1, ni siquiera fue posible detectar la presencia del producto del transgén en las líneas que fueron generadas. Todos estos datos sugieren que la expresión de estos transgenes puede ser letal para los animales durante el desarrollo embrionario.

El fondo genético no parece influir en el efecto de la expresión de los transgenes y el desarrollo de los fenotipos, ya que los animales pertenecen a dos cepas híbridas diferentes: en el caso de los transgenes bK5-hK10, las líneas **665**, **825**, y **821** pertenecen a la cepa B6CF₁, mientras que las líneas **1213** y **1227** son B6D2F₁; la línea **508**, transgénica bK5-hK1 es B6CF₁, y las otras 4 líneas con la misma construcción son B6D2F₁.

Para conocer el efecto que pudieran tener los transgenes durante el desarrollo embrionario se realizaron microinyecciones con la construcción bK5-hK10 sin dejar que la gestación de las hembras transferidas llegara a término: se extrajeron los embriones del útero materno a los 13.5 y 15.5 días de desarrollo. De las membranas de Reichert se extrajo ADN para analizar la presencia del transgén.

Las fechas en que se interrumpieron las gestaciones se eligieron por su importancia tanto en el desarrollo embrionario del ratón como en la expresión de la queratina mK5:

A los 13.5 d.p.c. ya se han formado todos los órganos y ocupan posiciones relativas similares a las del adulto. A los 15.5 d.p.c. se forma el estrato germinativo (Rugh 1990).

Respecto a la expresión de K5, a partir de los 13.5 d.p.c. el promotor bK5 es capaz

de dirigir la expresión del gen marcador lacZ a epitelios de lengua, paladar, epitelio oral, lomo, hocico (aunque no en todas las líneas analizadas); a partir de los 15.5 d.p.c. todas las líneas analizadas presentan una expresión continua en los epitelios de la cavidad oral, capa basal del peridermo y VRE de la vibrisas más avanzadas. Esencialmente, salvo alguna excepción observada en el tracto respiratorio y en el timo, la expresión observada para los transgenes de lacZ se correlaciona con la queratina endógena mK5 (Ramírez, 1993; Ramírez y cols. 1994).

Los datos obtenidos del estudio de los embriones transgénicos se resumen en la tabla VII: la eficacia de generación de transgénicos aumentó hasta un 24% al analizar embriones de 13.5 días y descendía a un 7.8% cuando se analizaban embriones de 15.5 días. Ambas cifras (aunque obtenidas de un total no muy numeroso de embriones) son muy superiores al 2.3% obtenido al analizar animales adultos, y diferentes entre sí; con un descenso del 24% al 7.8% del día 13.5 al día 15.5 de gestación, sugiriendo que parte de los embriones transgénicos no sobrevivían al desarrollo embrionario, lo que apoya la hipótesis anteriormente expuesta de que la expresión del transgén pueda ser causa de letalidad embrionaria. El paso entre los días 13.5 y 15.5 podría ser crítico para el desarrollo de los transgénicos.

construcción	nº individuos	hembras transferidas	tamaño medio de camada	transgénicos	eficacia	líneas	expresión
embriones:							
bk5-hk10 13.5d	37	7	5.2*	9	24%	-	NA
bk5-hk10 15.5d	38	10	3.8*	3	7.8%	-	NA
adultos:							
bk5-hk10	234	30	7.8	5	2.1%	5	5
bk5-hk1	180	27	7.2	5	2.7%	5	0

Tabla VII. Obtención de ratones transgénicos con las construcciones bk5-hk10 (adultos y embriones obtenidos a 13.5 y 15.5 días del período de gestación y bk5-hk1 (animales adultos). NA: no analizado

*:Todas las camadas obtenidas en el Servicio Animalario del CIEMAT en el período durante el cual se realizaron estas microinyecciones fueron de tamaño pequeño (4-6 animales), debido a las obras realizadas en el servicio contiguo al Servicio Animalario, que alteraron la gestación y cría de todos los animales.

En la actualidad se llevan a cabo los análisis histológicos y de la expresión del transgén en estos embriones para tratar de identificar la causa de la letalidad.

2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE K1 Y K10 BAJO EL CONTROL DE bK6 β

Para conocer el efecto de la expresión de los genes de las queratinas K1 y K10 en los tipos celulares en que se expresa la queratina K6, los ADNs genómicos de los genes de hK1 y hK10 se colocaron en posición 3' de un fragmento de 8.8 Kb que contiene elementos reguladores del gen de la queratina bovina bK6 β capaces de conferir tanto expresión específica de tejido como inducible en situaciones de hiperproliferación (Ramírez 1993; Ramírez y cols. 1995). Estas construcciones se microinyectaron en pronúcleos de ratón para analizar el efecto de su expresión en ratones transgénicos.

Como ya se ha mencionado, la queratina K6 tiene la particularidad de expresarse de forma constitutiva en células suprabasales de algunos epitelios, como lengua, paladar, vagina, VRE de folículos pilosos, etc... y de inducirse en epidermis interfolicular por estímulos (mecánicos, químicos...) que producen hiperproliferación. Es posible de esta forma, además de expresar las queratinas K1 y K10 en las zonas en que de forma natural se expresa la queratina K6 (estas queratinas no son coincidentes en ningún epitelio, con la excepción del epitelio del canal anal y exocérnix (Moll y cols. 1982), inducir la expresión de la proteína transgénica en condiciones tales como formación de tumores, cicatrización de heridas, agresiones mecánicas, tratamientos con TPA, ácido retinoico, etc...

2.1. CONSTRUCCIONES GÉNICAS EMPLEADAS Y SU EXPRESIÓN EN CÉLULAS EN CULTIVO

La figura 17 muestra las construcciones génicas empleadas, en las que los fragmentos genómicos que codifican para las queratinas humanas K1 y K10 se hallan bajo el control de las secuencias reguladoras de la queratina bovina bK6 β .

Estas construcciones (bK6 β -hK1 y bK6 β -hK10) son funcionales, y las proteínas que codifican son capaces de integrarse en un citoesqueleto celular y formar filamentos en células en cultivo, como lo demuestran las transfecciones transitorias realizadas en las líneas celulares epiteliales BMGE+H y MCA3D (figura 18). La detección de la proteína transgénica se realizó por inmunofluorescencias indirectas utilizando los anticuerpos monoclonales K α 8.60 y AE2. Con esta información, que demuestra la funcionalidad de los transgenes ensayados, se prepararon los ADNs para la microinyección en pronúcleos de embriones de ratón.

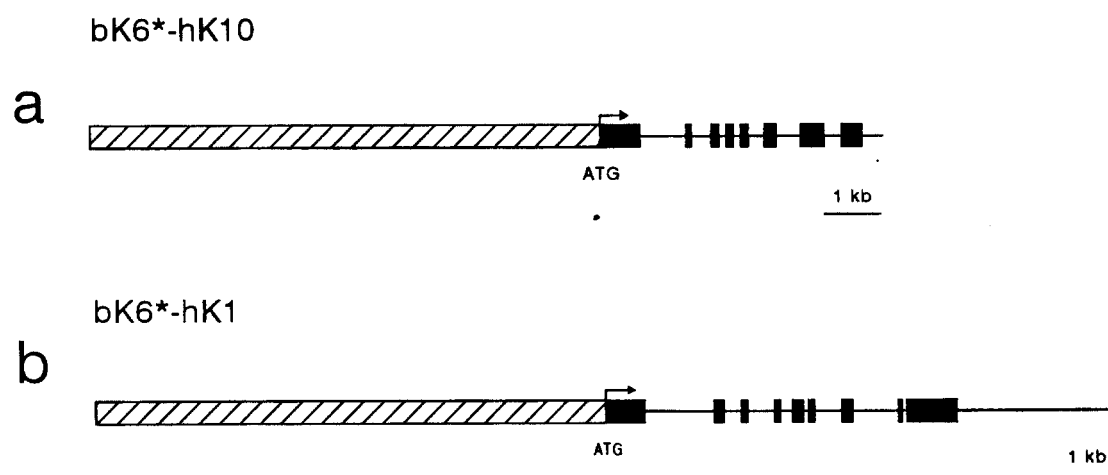


Figura 17. Esquema de las construcciones génicas que contienen los genes de las queratinas humanas hK10 (a) y hK1 (b) bajo el control del promotor de bK6 β . Los rectángulos rayados corresponden a las secuencias reguladoras del gen de la queratina bovina bK6 β , los rectángulos negros a los exones, las líneas horizontales indican intrones y secuencias flanqueantes 3'. Las flechas señalan el origen de la transcripción.

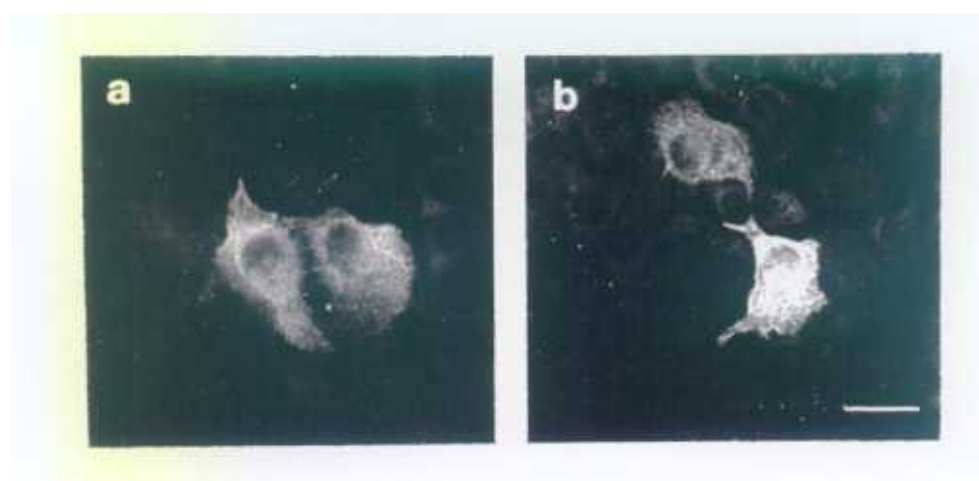


Figura 18. La expresión de los transgenes de hK10 (a) y hK1 (b) se visualiza en células MCA3D (a) y BMGE+H (b) transfectadas con las construcciones bK6 β -hK10 (a) y bK6 β -hK1 (b), mediante inmunofluorescencias indirectas utilizando el anticuerpo monoclonal K $_8$.60. Barra, 7 μ m.

2.2. GENERACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS

2.2.1. Construcción bK6β-hK10

De las hembras transferidas con embriones microinyectados con el ADN de bK6β-hK10, nacieron 169 ratones que llegaron a edad adulta. El *Southern blot* realizado para identificar aquellos de los ratones que habían integrado el transgén en su genoma reveló que sólo 6 de todos los ratones, de los que se obtuvo muestras de ADN genómico de los tejidos de la cola, eran portadores del transgén. Como sonda se utilizó hK10.BamHI (figura 19a). El cálculo del número de copias integrado en cada uno de los casos se realizó por comparación de la intensidad de las bandas obtenidas en las distintas líneas transgénicas con diferentes cantidades del transgén, equivalentes a diferente número de copias (figura 19b).

De 6 fundadores obtenidos con la construcción bK6β-hK10, (5 con la integración correcta del transgén, es decir, varias copias integradas de forma que se ordenan unidas cabeza con cola, sin detectarse reordenaciones en la estructura (figura 19c), sólo ha sido posible el establecimiento de líneas de ratones transgénicos con dos de ellos. En otras dos de las líneas analizadas, los descendientes transgénicos mueren selectivamente entre el tercer y cuarto día de vida. Los datos referentes al número de copias del transgén integrados en cada caso y a los problemas de viabilidad de las distintas líneas se resumen en la tabla VIII.

línea	nº copias	viabilidad
176	~ 25	normal
1357	~ 25	normal
221	~ 100	♂ fundador muere sin descendencia con 3 meses
1295	~ 100	hijos TG mueren entre 3-4 días
1358	> 150	hijos TG mueren entre 3-4 días.

Tabla VIII. Caracterización de las líneas transgénicas bK6β-hK10.

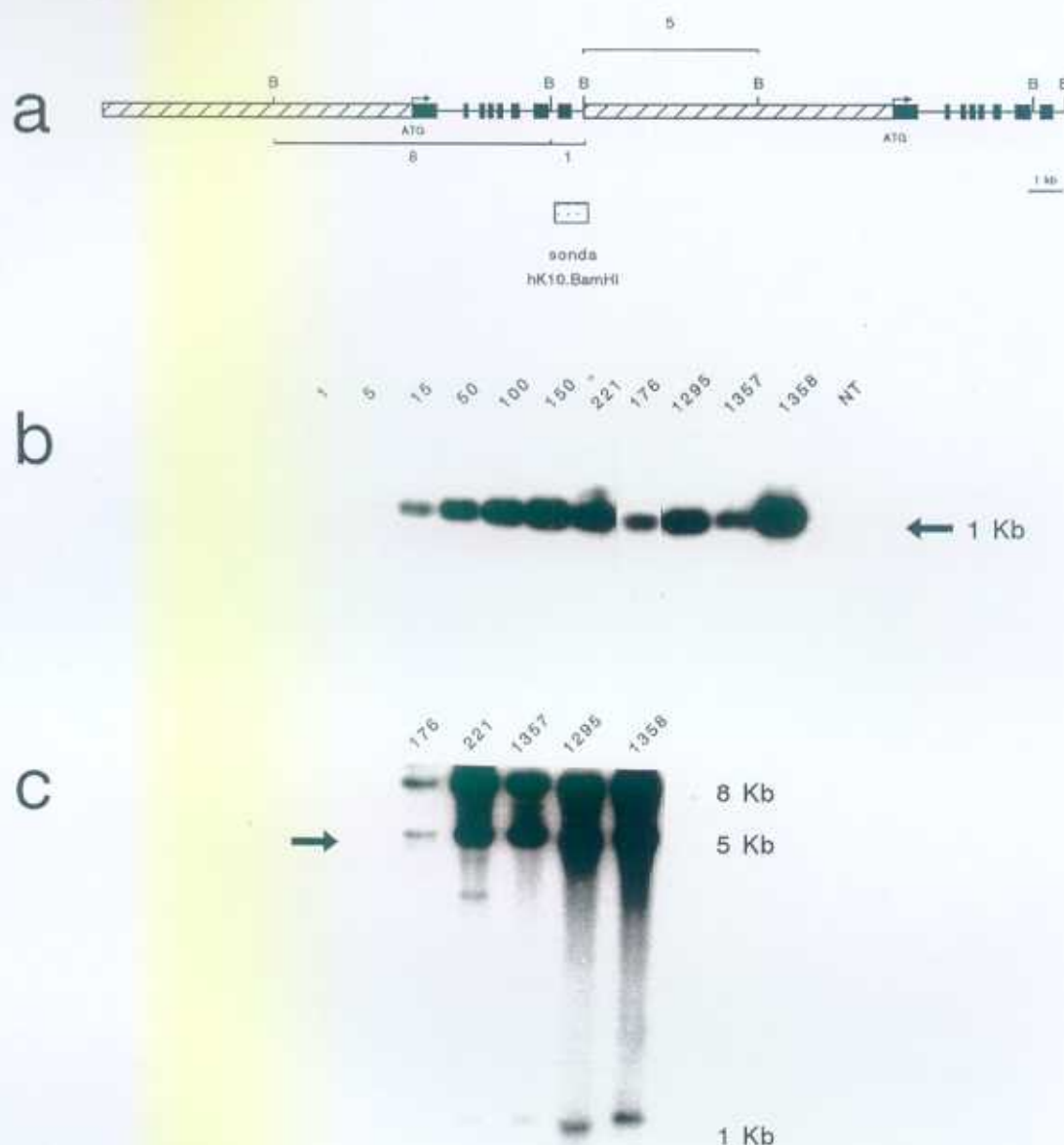


Figura 19. Estructura y n° de copias del transgén en líneas portadoras de bK6β-hK10. **a)** Esquema de los transgenes integrados en orientación cabeza-cola. B:BamHI. **b)** Análisis por *Southern blot* de 5 µg de ADN genómico de ratones transgénicos y no transgénicos digeridos con BamHI en el siguiente orden: los carriles señalados como 1, 5, 15, 50, 100, 150 contienen respectivamente 5, 25, 75, 250, 500, 750 pg del transgén que representan 1, 5, 15, 50, 100, 150 copias por célula, fundador 221, líneas 176, 1295, 1357, 1358, no transgénico (NT). Se utilizó la sonda hK10.BamHI, del extremo 3' de la queratina hK10. La aparición de una banda de ~ 1 Kb indica la presencia del transgén (flecha). **c)** *Southern blot* de ADN genómico de ratones transgénicos de las líneas 176, fundador 221, líneas 1295, 1357, 1358 digerido con BamHI. Como sonda se utilizó el transgén completo. La aparición de una banda de ~5 Kb es indicativa de las uniones cabeza-cola (flecha). No se han producido reordenaciones detectables en el transgén, ya que se observa el patrón de bandas esperado en todos los casos. La banda de ~1Kb no se aprecia en la figura para la línea 176, en virtud de la cantidad de ADN cargado, la digestión enzimática y las pocas copias del transgén integradas.

2.2.2. Construcción bK6 β -hK1

Se microinyectó el ADN de la construcción bK6 β -hK1 en pronúcleos de embriones de ratón y nacieron 180 animales. La identificación de los ratones transgénicos por *Southern blot* mostró la aparición de una banda correspondiente a la integración del transgén en el genoma de ratón en tan sólo 5 de los animales nacidos (4 con al menos algunas copias con la integración correcta). Como sonda se utilizó hK1.BamHI (figura 20a). De forma similar a lo observado en algunas de las líneas de la construcción bK5-hK1 (ver apartado 2.2.2, página 41), en dos de las líneas obtenidas (líneas **798** y **1055**), varias de las copias del transgén se integraban de forma reordenada o parcialmente deletionada. Este fenómeno se ha descrito en transgenes de otras queratinas, sin impedir la expresión correcta del transgén (Neznanov y cols. 1993), sin embargo no se especifica que ocurra en otros transgenes con hK1 (Blessing y cols. 1993; Chung y cols. 1994), por lo que no podemos concluir que sea un efecto intrínseco del transgén. A pesar ello, la mayoría de las copias en cada línea se integraban completas (comprobado al hibridar con una sonda del transgén completo el ADN digerido con SnaBI, no mostrado). Las distintas líneas integraron un número variable de copias por célula (figura 20b).

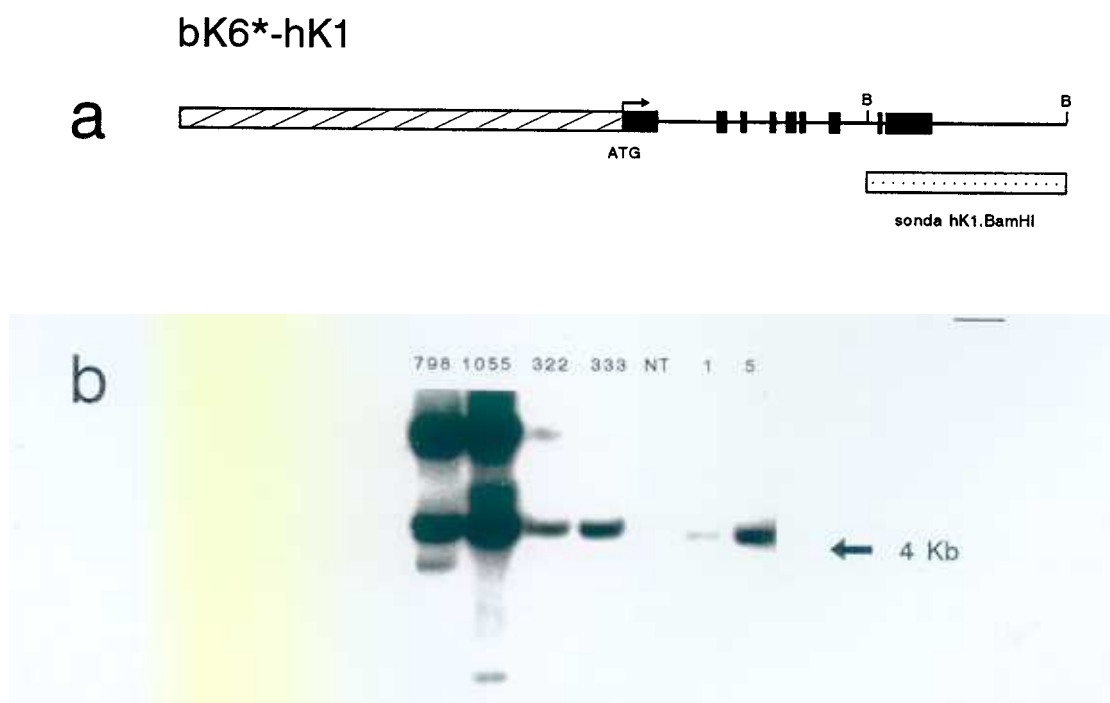


Figura 20. Identificación por *Southern blot* de ratones transgénicos bK6 β -hK1. **a)** Esquema del transgén y la sonda utilizada en el *Southern blot* (**b**). **b)** Se digirieron 5 μ g de ADN genómico procedente de cola con BamHI. Para detectar el transgén se utilizó la sonda hK1.BamHI. La banda ~4 Kb indica la presencia del transgén (flecha). Los carriles 798, 1055, 322, 333 corresponden a las líneas 798, 1055, 322, 333 respectivamente, NT: ADN de ratón no transgénico; en los carriles 1, 5 hay cargadas 1 y 5 copias respectivamente del transgén por célula. Las líneas 322 y 333 no integran copias reordenadas.

Todos los fundadores transgénicos se cruzaron con normalidad, estableciéndose líneas de animales transgénicos con todos ellos en las proporciones mendelianas esperables; los ratones así generados no presentaban rasgos morfológicos o fenotípicos que los distinguieran de ratones control, o de sus hermanos no transgénicos, ni reducción en su duración media de vida.

2.3. EXPRESIÓN DE K10 EN ANIMALES TRANSGÉNICOS: LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA

2.3.1. Expresión en animales adultos

Con el fin de conocer el patrón de distribución de la proteína humana en los ratones transgénicos, se sacrificaron animales adultos F₁ hemicigotos y F₂ homocigotos de las líneas 176 y 1357, se prepararon criosecciones de diferentes tejidos, y se analizaron por inmunofluorescencias indirectas con anticuerpos específicos de la queratina K10 humana, (ver Materiales y Métodos), principalmente AE2, con el que se obtuvieron mejores resultados. El patrón de expresión de la construcción bK6 β -hK10 coincide con el patrón de tinción observado para la expresión constitutiva de la queratina K6, cuyo promotor dirige la expresión del transgén (Ramírez, 1993; Ramírez y cols. 1995;). La tabla IX y la figura 21 resumen la expresión de K10 bajo el control de bK6 β . La epidermis interfolicular es negativa para el anticuerpo AE2, que reconoce de forma específica el producto del transgén, y positiva en la vaina radicular externa de los folículos pilosos. También se detecta expresión en capas suprabasales de otros epitelios de la cavidad bucal y el tracto digestivo. El patrón de expresión para homocigotos de las líneas 176 y 1357 es similar al obtenido para animales heterocigotos.

TEJIDO	LÍNEA	
	176	1357
EPIDERMIS		
lomo	+(folículos)	+(folículos)
plantar	-	-
cola	+(folículos)	+(folículos)
FOLÍCULOS	+(VRE)	+(VRE)
EPITELIOS INTERNOS		
lengua	+	+
paladar	+	+
epit. nasal	-	+
esófago	-	+
estómago aglandular	+	+
OTROS ¹	-	-

Tabla IX. Análisis de expresión del transgén bK6b-hK10 en las líneas 176 y 1357.

1: estómago glandular, hígado, pulmón, vejiga, riñón, corazón, cerebro, bazo, timo.

2.3.2. Expresión del transgén en la fundadora 1358

Se analizó la expresión del transgén en los tejidos de la fundadora **1358** (muerta de parto), localizándose la proteína por inmunofluorescencia con el anticuerpo AE2. En la figura 22 se muestran algunos resultados representativos de la detección del transgén en diferentes tejidos: se detectó expresión en tejidos como epidermis de la cola, folículos pilosos, epitelios del paladar, lengua, región plantar y estómago aglandular. No se detectó expresión en otros tejidos que expresan la queratina K6 tales como epitelio del esófago o epitelio nasal, ni en órganos en los que los componentes epiteliales no contienen mK6 tales como bazo, riñón, pulmón o hígado. Al contrario de lo observado en los descendientes de los fundadores **176** y **1357**, en los que la expresión del transgén era continua en los epitelios analizados, en la fundadora **1358** esta expresión era mosaico (compárese las figuras 22a y b con las figuras 21d y c2 respectivamente)

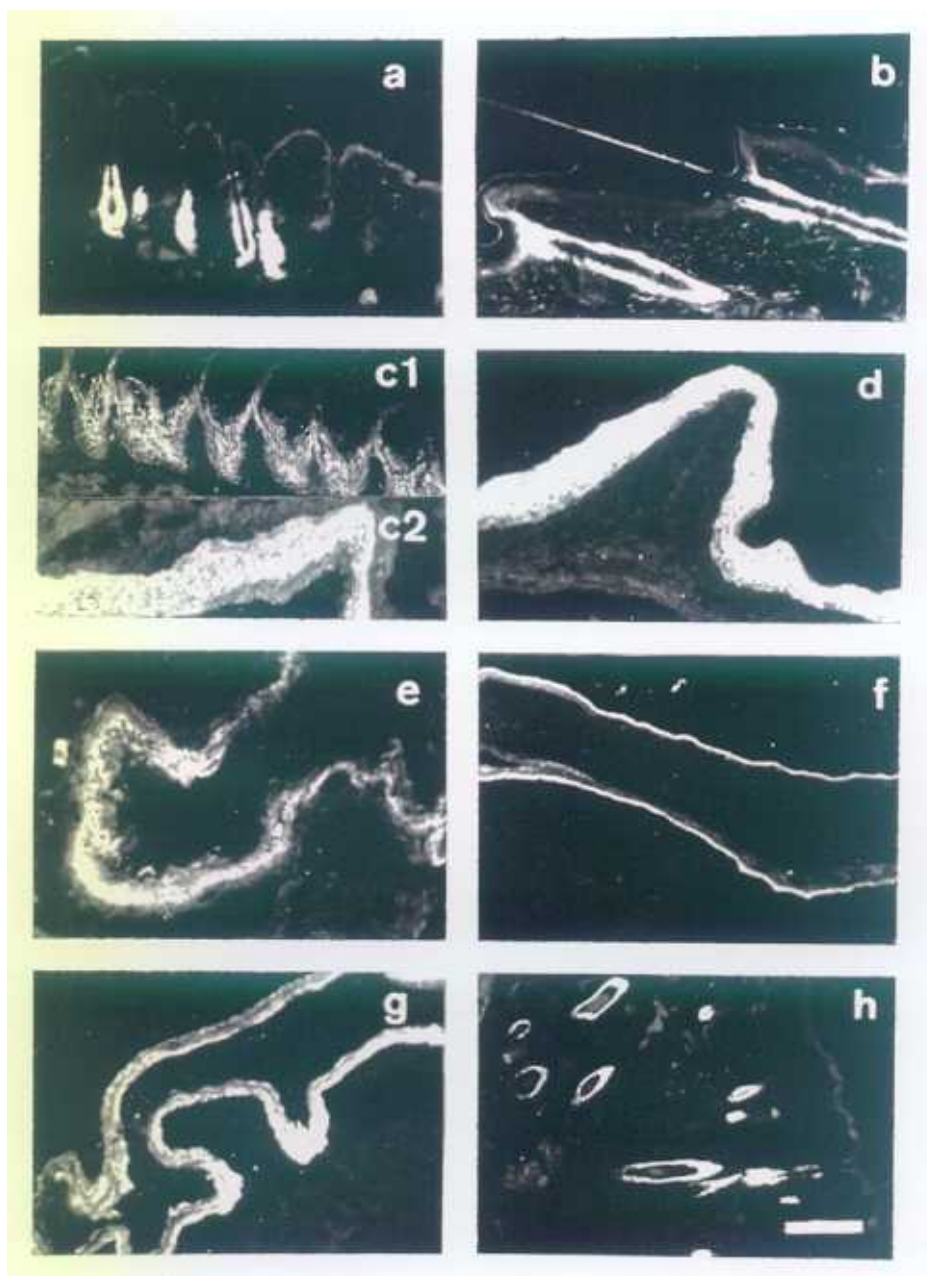


Figura 21. Expresión del transgén bK6B-hK10 en tejidos de animales adultos. Criosecciones de tejidos de animales adultos se analizaron por inmunofluorescencia indirecta frente al anticuerpo monoclonal AE2, específico de la queratina hK10; secciones de piel del lomo (a), piel de la cola (b), epitelio de la lengua dorsal (c1) y ventral (c2), paladar (d), esófago (e), fosas nasales (f), estómago aglandular (g), folículos pilosos (h). Todas las secciones corresponden a la línea 1357. Barra, 30 μ m. Criosecciones de ratones no transgénicos no reaccionaron con este anticuerpo (no mostrado).

Quiere esto decir que el transgén se está expresando en sólo una parte de las células del epitelio, cuando potencialmente debería expresarse en todas. Este mosaicismo en la expresión es, probablemente, debido a que la integración del transgén tras la microinyección tuvo lugar después de la primera división celular del embrión, originando una fundadora que no porta el transgén en todas sus células, constituyendo, por tanto un caso de mosaicismo genético (Wilkie y cols. 1986; Withelaw y cols. 1993). En estos casos no hay una transmisión del transgén a la descendencia en proporciones mendelianas, sino menor. En nuestro caso, un 40% de los hijos de la fundadora **1358** son transgénicos, inferior al 50% esperado según herencia mendeliana del transgén. En el caso de la fundadora **1295**, sólo un 27% de sus hijos eran transgénicos, lo que sugiere que también esta fundadora es un caso de mosaicismo genético y de expresión.

Los datos sugieren que esta expresión en mosaico, permite la viabilidad de las fundadoras **1295** y **1358** y su fertilidad, ya que como se detallará más adelante, los hijos heterocigotos nacidos de ellas, con expresión continua del transgén (figura 22c, d, e, f y g), mueren durante los tres primeros días de vida postnatal.

2.3.3. Expresión del transgén en recién nacidos de las líneas 1295 y 1358

Los descendientes transgénicos de las líneas **1295**, y **1358** mueren selectivamente entre el tercer y cuarto día de vida. El análisis de la expresión de la proteína transgénica por inmunofluorescencia de criocortes revela que la expresión de hK10 en animales recién nacidos de ambas líneas coincide con la de mK6 en la VRE de los folículos pilosos, surco labial y epitelios del paladar, lengua, región plantar, región oral y faringe (figura 22).

La epidermis interfolicular da una tinción continua, positiva con el anticuerpo AE2 (figura 22g), aunque dobles tinciones usando también un anticuerpo contra mK6 indican que sólo una parte de las células suprabasales de epidermis expresan K6.

El resultado más importante de estas inmunofluorescencias fue el revelar la existencia de una importante lesión en el epitelio lingual de estos animales (compárense las figuras 22c y d con 21c1) con una fuerte expresión de la proteína transgénica, no detectada anteriormente y que nos llevó a realizar un detallado estudio histológico de estos animales.

El patrón de expresión de la proteína transgénica es el mismo en las líneas **1295** y **1358**, con resultados indistinguibles para los ratones derivados de cada una de las dos líneas.

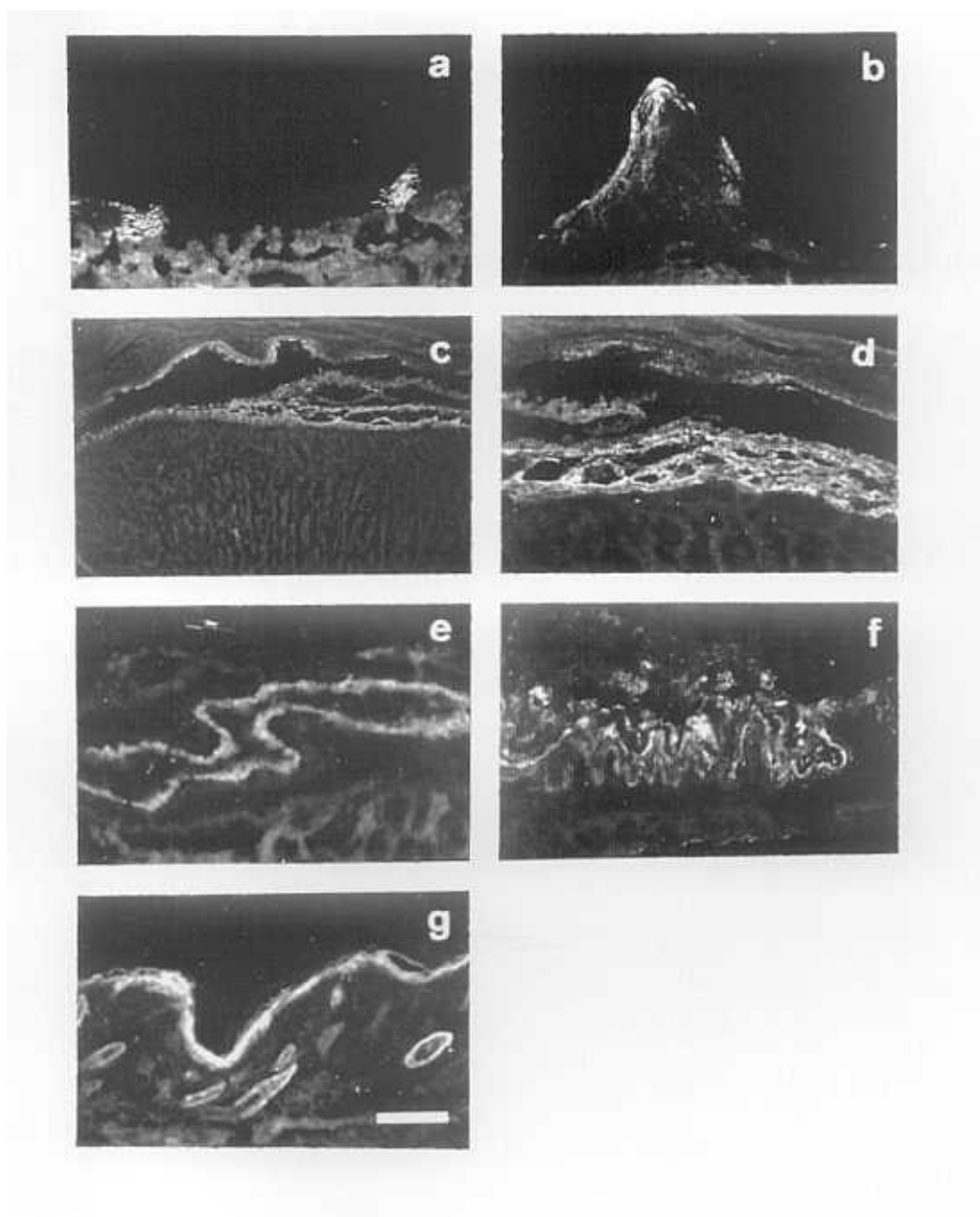


Figura 22. Expresión del transgén bk6 β -hK10 en la fundadora 1358 (a y b) y en recién nacidos de las líneas 1295 y 1358 (c-g). Se ensayaron crio-secciones de animales transgénicos para hK10 (mediante inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo AE2); secciones de lengua (a) y paladar (b), donde se ve la expresión en mosaico (en los tejidos en que los hijos sufren lesiones); lengua y paladar (c), detalle de la región representada en c (d), esófago (e), estómago (f), lomo (g). Todas las secciones corresponden a la línea 1358. Barra, 75 μ m (c); 30 μ m (el resto).

2.4. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE HK10 BAJO EL CONTROL DE BK6ß

2.4.1. Alteraciones fenotípicas producidas en las líneas 1295 y 1358

En el momento del nacimiento ninguna característica macroscópica distinguía a los ratones transgénicos de las líneas **1295** y **1358** de sus hermanos de camada no transgénicos; sin embargo, a los dos días los transgénicos frenaban su crecimiento, posteriormente no se observaba ningún contenido en su estómago y no sobrevivían en ningún caso al cuarto día de vida. Entonces su peso medio era de 1.4g frente a los 2.9g de media que pesaban sus hermanos (figura 23a). En este momento presentaban una lesión en el dorso de la lengua (figura 23b) de aspecto similar a las leucoplasias orales (Greenspan y cols. 1984; Lever y Schaumburg-Lever, 1990), de crecimiento progresivo. En esta misma región coexisten las proteínas K6 endógena, y K10 transgénica (figura 22c y d). La queratina K6 es una de las queratinas más abundantes en la lengua de ratón (Schweizer, 1992). Los mecanismos que regulan su expresión no son conocidos, pero dada la expresión inducible de K6 ante estímulos mecánicos, es posible que la fricción del pezón sobre la lengua durante la lactación actúe como inductor de la expresión de mK6, y por consiguiente de hK10 en los animales transgénicos. La presencia de hK10 aparentemente conduce a una serie de lesiones, en particular en la superficie dorsal de la lengua, que se describen a continuación. La severidad de las lesiones linguales que crece con el tiempo imposibilita la toma de alimento en los animales y, por consiguiente provoca su muerte por inanición. De hecho, alimentando los transgénicos por vía subcutánea, con suero glucosado al 5%, se consiguió que dos animales llegaran hasta los 6 días de vida, y un tercero hasta los 7 días.

El análisis histológico de estos ratones reveló las alteraciones morfológicas, que se describen a continuación:

Alteraciones en lengua:

Los recién nacidos transgénicos nacen con una placa blanquecina (leucoplasia), visible, sobre el dorso de la lengua (figura 23b), que hasta los 3-4 días de vida va aumentando progresivamente y, a partir del quinto día comienza a desprenderse (figura 23h). Microscópicamente los tejidos que componen la lengua son histológicamente normales, a excepción del epitelio del dorso que constituye la placa. En dicho epitelio existe una clara hiperplasia de células basales así como un considerable aumento de las capas suprabasales, las cuales sufren un proceso de necrosis por coagulación de las proteínas en la que, tras la intensa queratinolisis, todavía es posible observar los perfiles de las papilas linguales (figura 23d-g).

Flanqueando la leucoplasia y en la punta y base de la lengua, el epitelio muestra idénticas características a las observadas en los controles (figura 23e), con una sola capa de células basales, con núcleo ovoideo, basófilo, situado perpendicularmente a la membrana basal, formando empalizada. En cambio, en la lesión de la leucoplasia, debido a la hiperplasia, se observan entre 6 y 8 capas de células basales, en las cuales se ha perdido la polaridad celular (figura 23g). Esta intensa actividad mitótica da como resultado un gran aumento de las capas suprabasales en la placa, que sufren una necrosis muy rápida, la cual se observa como una masa homogénea, acidófila, en que se distinguen borrosamente, los restos basófilos de los núcleos pertenecientes a los queratinocitos (figura 23f). En ocasiones se observa la formación de lagunas, múltiples, en la zona de necrosis, con numerosas células acantolíticas libres en la luz. Tampoco es rara la exocitosis, o migración de células inflamatorias hacia la zona de necrosis, fundamentalmente linfocitos.

A partir de los 5 días de edad, la placa comienza a desprenderse, hasta desprenderse en casi su totalidad, al alcanzar los 7 días, edad máxima de supervivencia de los recién nacidos transgénicos, conseguida con alimentación parenteral de suero glucosado. Al desprenderse hacia la cavidad bucal, en el dorso de la lengua permanecen restos de células basales en una distribución periódica, alternando con papilas dérmicas, patrón característico de las papilas linguales (figura 23h). Estas células basales sufrían un edema intracelular grave que se manifiesta por espongiosis difusa con la formación de vesículas múltiples subepiteliales, debido a la proyección de la membrana basal hacia el tejido conjuntivo subyacente (figura 23h).

Alteraciones en encías y dientes:

En todos los transgénicos analizados, además de la leucoplasia constante en la lengua, se observa necrosis por coagulación de las capas suprabasales del epitelio gingival, afectando en todos los casos al incisivo inferior (figura 23l) y, en ocasiones, también al epitelio gingival del incisivo superior, aunque de forma mucho más leve. Se observa, además, una gran precocidad en la dentición del incisivo inferior con respecto de sus hermanos no transgénicos (figura 23k), encontrándose a los 4 días muy próximos a la erupción.

Además de las lesiones descritas que presentaron todos los recién nacidos transgénicos, algunos de ellos mostraron alteraciones secundarias en la odontogénesis tales como defectos morfológicos en la posición de los dientes, microdoncia, asociándose dicha microdoncia con ausencia de dentina, procesos degenerativos en la matriz del esmalte, atrofia de la capa de ameloblastos y falta de desarrollo dental.

Alteraciones en paladar:

En los transgénicos analizados se observa una moderada hiperplasia del epitelio con discreta acantosis (aumento del estrato espinoso) e hipergranulosis (aumento del estrato granuloso), detalles indicativos de hiperproliferación (figura 23n), en comparación con los controles (figura 23m). Además, en los transgénicos, comienzan los fenómenos degenerativos en la superficie epitelial, con características similares a las observadas en el epitelio de la lengua y gingival.

Alteraciones en estómago:

En todos los transgénicos analizados se observa una hiperqueratosis ortoqueratótica, de moderada a severa, en el epitelio plano estratificado queratinizado de la porción aglandular, caracterizada por un aumento en el espesor de la capa córnea acelular (figura 23j), en comparación con los controles (figura 23i) mantenidos sin mamar.

Alteraciones en piel:

En todos los transgénicos analizados existe una hiperqueratosis ortoqueratótica generalmente moderada en la epidermis (figura 23p). En comparación con los controles mantenidos sin mamar (figura 23o), se observa un aumento del estrato granuloso y del estrato córneo acelular, con la formación ocasional de tapones por acúmulo de queratina en la salida de los folículos pilosos. Tanto en los recién nacidos transgénicos como en los controles, la estructura histológica de los folículos pilosos es la normal, correspondiendo a la fase anagénica del crecimiento del pelo característica de la edad de los individuos analizados.

En los ratones que sobrevivieron al cuarto día mediante alimentación parenteral, se observaron áreas de espongiosis en la corteza cerebral, asociada en uno de ellos, a una meningoencefalitis no purulenta, caracterizada por el acúmulo de células mononucleares, fundamentalmente linfocitos. Es posible que, estas lesiones, que sólo aparecieron en los recién nacidos transgénicos alimentados con suero a partir del quinto día, sean debidas a fases de hipoglucemia, secundarias a la alimentación parenteral.

En resumen, podemos señalar que, al igual que ocurría para los transgenes bK5-hK10, los ratones transgénicos descendientes de las líneas que han integrado un número mayor de copias desarrollan lesiones fenotípicas severas. Estas lesiones se manifiestan por una diferenciación muy acelerada, con un aumento de las capas suprabasales que se traduce rápidamente en degeneración y necrosis del epitelio allí donde existe una fuerte expresión de la proteína transgénica hK10.

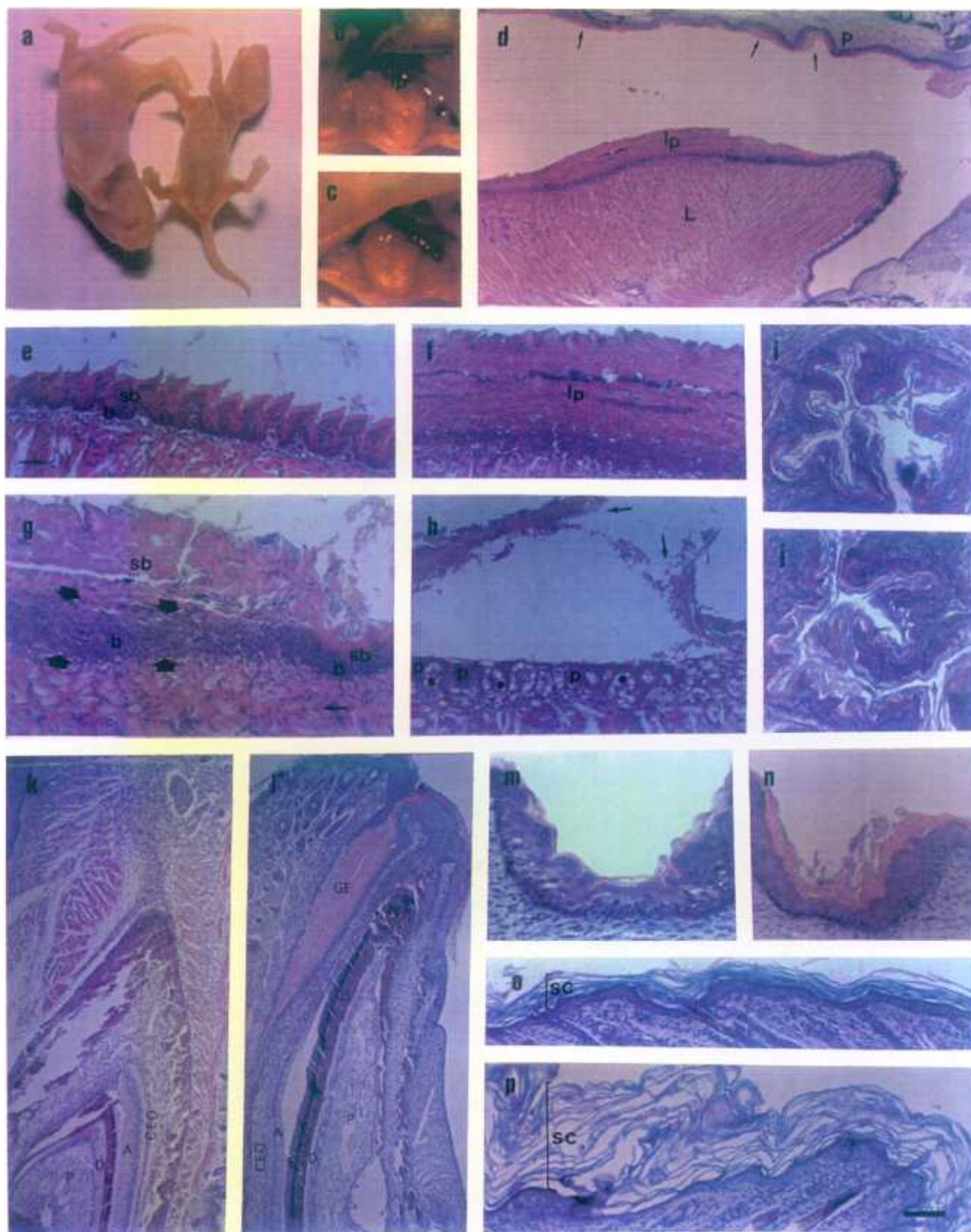


Figura 23. a) ratón transgénico bK6 β -hK10 de la línea 1295 (derecha) y hermano de camada (izquierda) a los 4 días de edad. b y c) aspecto macroscópico de la leucoplasia (lp); ratón transgénico de la línea 1358 (b) y hermano de camada (c). d-p) Alteraciones morfológicas observadas en los recién nacidos transgénicos bK6 β -hK10. d) Región oral de un ratón transgénico (las flechas señalan los fenómenos de degeneración epitelial). e-h) Epitelio lingual: e) epitelio de la lengua de un ratón control, f) detalle de la leucoplasia, g) zona límite de la leucoplasia en el dorso de la lengua, h) aspecto de la leucoplasia desprendida en un ratón transgénico de 7 días de edad (flechas), b: capa basal,

sb: capa suprabasal, p: papilas dérmicas, los asteriscos señalan las zonas de espongiosis, la línea discontinua demarca los perfiles de las papilas linguales, la flecha indica la dirección hacia la faringe, las flechas gruesas en g) demarcan la hiperplasia basal. i), j) Estómago. k) Incisivo inferior de un ratón control y l) transgénico, GE:epitelio gingival, CEO: órgano del esmalte, A: ameloblastos, E: matriz del esmalte, D: dentina, P: pulpa del diente. m), n) Paladar. o), p) Epidermis, SC:estrato córneo. L: lengua, P: paladar, lp: leucoplasia. e, i, k, m, o corresponden a órganos controles. d-j: línea 1358; k-p: línea 1295. Barra, 3 μ m (d); 5 μ m (k, l); 13 μ m (e-j, o, p); 20 μ m (m,n).

2.5. NO SE DETECTA EXPRESIÓN DE K1 EN NINGUNA DE LAS LÍNEAS PORTADORAS DEL TRANSGÉN bK6 β -hK1

De forma similar a lo que ocurría en el caso de los ratones transgénicos bK5-hK1, no ha sido posible detectar la expresión de la queratina K1 humana en los tejidos de líneas de animales portadores del transgén bK6 β -hK1.

Criosecciones de diversos epitelios de todas la líneas de ratones transgénicos, teñidas por inmunofluorescencias con los anticuerpos KA5, EAB904 y AE2 no dieron ninguna señal positiva que los distinguiera de las tinciones realizadas en sus hermanos no transgénicos (no mostrado).

En procesos de inducción de K6 por aplicaciones tópicas de ácido retinoico y TPA (ver apartado 2.7) en la piel de la cola las líneas 322 y 333 (que son las líneas que han integrado todas las copias del transgén completas), se analizó la expresión del transgén por inmunofluorescencias y *Northern blot*, no detectándose ningún producto de la transcripción ni traducción de la queratina K1 humana en ninguna de las dos líneas (no mostrado).

Finalmente, se realizaron cultivos primarios de queratinocitos de piel del lomo de recién nacidos de las líneas 333, 798, y 1055, sin detectarse tampoco la proteína transgénica inducida en los cultivos celulares, ni cuando se realizaron tinciones por inmunofluorescencia, ni por inmunoperoxidasas.

Se cruzaron animales transgénicos bK6 β -hK10 de la línea 176, con transgénicos bK6 β -hK1 de las líneas 322 y 333, con el fin de obtener dobles transgénicos para los genes humanos de K1 y K10, y ver si la expresión de hK10 tenía algún efecto sobre los transgenes de hK1, ya que, al menos en cultivos celulares, se sabe que la estabilidad de una queratina es dependiente de la presencia de su pareja (Kulesh y Oshima 1988; Lersch y cols. 1989). Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos para transgénicos portadores de hK10 sólo: no se detectó expresión por inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen hK1 de forma específica (EAB904 y KA5), descartando la posibilidad de una estabilización

de la hK1 dependiente de la hK10 en los ratones transgénicos. Por otro lado, Rosenthal y cols. 1991, no detectan colocalización de hK1 con mK10 en dobles tinciones en los cultivos primarios de queratinocitos de animales transgénicos para hK1 crecidos en alto calcio.

El conjunto de datos sugiere que el reducido número de ratones transgénicos obtenido para el transgén de hK1 portan el transgén inactivo; es decir, que sólo nacen aquellos que no tienen la capacidad de sintetizar el ARN o la proteína transgénica (al menos en unos niveles detectables por los ensayos utilizados), lo que sugiere que la expresión de hK1 en tipos celulares donde normalmente no está presente pueda tener algún efecto deletéreo sobre el desarrollo del animal.

2.6. LETALIDAD EN LOS RATONES bK6 β -hK10 Y bK6 β -hK1. ANÁLISIS DE EMBRIONES PORTADORES DEL TRANSGÉN bK6 β -hK1

Los datos de generación de ratones transgénicos con las construcciones que llevan el promotor de bK6 β se resumen en la tabla X. Igual que ocurría con los transgenes dirigidos a capas basales de epidermis, los datos de eficacia de generación de animales transgénicos son muy inferiores al 10-15% que cabe esperar: sólo un 3.5% del total de nacidos portaban el transgén bK6 β -hK10, y un 2.7% de los nacidos portaba el transgén bK6 β -hK1. En este caso, como se comentó anteriormente para los transgenes portadores del promotor bK5, también se realizaron pruebas variando los factores que afectan a la integración del transgén en el genoma huésped sin obtener mejoras. El fondo genético (se utilizaron animales B6CF₁ y B6D2F₁) tampoco parece influir. Desconocemos la razón por la que la proporción de transgénicos obtenidos es tan baja; es posible que la sobreexpresión o la expresión ectópica de los genes de hK1 y hK10 tengan efectos deletéreos durante el desarrollo embrionario del ratón.

Este argumento viene apoyado por la muerte prematura de los animales de las líneas **1295** y **1358** (las que integran un mayor número de copias y expresan el transgén de forma genuinamente ectópica), mientras que las fundadoras son viables y fértiles probablemente porque, como se ha mencionado, son mosaicos genéticos y de expresión.

En ninguno de los transgenes de hK1 fue posible detectar la expresión de la proteína humana; una explicación posible es que sólo hayan superado el desarrollo embrionario y llegado a adultos aquellos animales que no expresaran el transgén o lo hicieran en muy pocas células, por debajo del nivel de detección de las técnicas ensayadas. Con el fin de estudiar el posible efecto deletéreo de estos transgenes, se realizaron microinyecciones con la construcción bK6 β -hK1, y se extrajeron los embriones de las hembras transferidas a los días

13.5 y 15.5 de gestación. Con el ADN obtenido de las membranas de Reichert se comprobó los que habían integrado el transgén.

Aunque no se conoce el patrón de expresión de la queratina K6 durante la embriogénesis de ratón, sí existen datos parciales sobre la expresión durante el desarrollo embrionario de lacZ dirigido por las secuencias reguladoras de bK6 β utilizadas en este trabajo (Ramírez 1993) en las fechas en las que se interrumpió la gestación. A los 13.5 d.p.c. se detecta expresión (tinción tenue y mosaico) en la región oral. A los 15.5 d.p.c esta expresión, aunque mosaico, es mucho más intensa y se extiende a otros epitelios tales como los folículos de las vibrisas, y zonas de piel de diferente localización.

Como se ve en la tabla X, un 15% y un 10.2% de los ratones analizados en los días de gestación 13.5 y 15.5 respectivamente son transgénicos, ambas cifras muy superiores al 2.7% obtenido cuando se deja que el desarrollo embrionario llegue a término y crecen los animales. Aunque el número total de embriones no es excesivamente alto, se observa que el número de ratones transgénicos obtenido a día 15.5 es inferior al obtenido a día 13.5, de acuerdo con la hipótesis de un posible efecto deletéreo del transgén para estos animales durante el desarrollo embrionario.

construcción	nº individuos	hembras transferidas	tamaño medio de camada	transgénicos	eficacia	líneas	expresión
embriones:							
bK6 β -hK1 13.5d	60	8	7.5	9	15%	-	NA
bK6 β -hK1 15.5d	39	7	5.5	4	10.2%	-	NA
adultos:							
bK6 β -hK1	180	31	5.8	5	2.7%	5	0
bK6 β -hK1	169	26	6.5	6	3.5%	(4)	4

Tabla X. Obtención de ratones transgénicos con las construcciones bK6 β -hK10 (animales adultos) y bK6 β -hK1 (adultos y embriones obtenidos a 13.5 y 15.5 días del período de gestación. NA: no analizado)

En la actualidad se está llevando a cabo el análisis de estos embriones para tratar de encontrar anomalías que expliquen la aparente letalidad de estos transgenes.

2.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN INDUCIDA DEL TRANSGÉN bK6β-hK10

En situaciones de hiperproliferación la queratina K6 se induce en los queratinocitos epidérmicos hasta constituir una proteína mayoritaria. Su expresión se considera un marcador de hiperproliferación de piel (Weiss y cols. 1984), y de otras situaciones patológicas (Sellheyer y cols. 1993) en las que se altera la diferenciación del tejido.

Ramírez (1993), Ramírez y cols. (1995), demostraron la capacidad del fragmento 5' de 9 Kb de la queratina bK6β de inducir la síntesis de lacZ en respuesta a diversos agentes causantes de hiperproliferación: aplicaciones tópicas de AR, TPA, procesos de cicatrización, procesos tumorales, también se induce su expresión en cultivos primarios de queratinocitos. El objeto de este estudio se centra en comprobar la inducibilidad del transgén debida a la acción de distintos agentes con dos objetivos fundamentales: a) conocer el efecto de la síntesis mayoritaria de proteína transgénica debida a la inducción en áreas hiperproliferativas, b) como paso previo a la aplicación de protocolos de carcinogénesis en piel de ratón. Las queratinas mK1 y mK10 desaparecen progresivamente a lo largo de la carcinogénesis de piel, no detectándose en el estadio de carcinoma, lo que se ha interpretado como indicación de que estas queratinas pudieran ser incompatibles con estados de rápida proliferación. Haciendo uso de la inducibilidad del promotor bK6β en estos tumores, es posible expresar en ellos la queratina hK10 y estudiar los efectos de su presencia sobre la evolución tumoral.

Se trataron tópicamente colas de animales adultos de las líneas **176** y **1357** con dosis diarias de 30 µg de ácido retinoico *todo trans* (AR) durante 14 días, y con siete dosis a días alternos de 20 nmoles de 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA). Alternativamente se aplicaron dos dosis de 20 nmoles de TPA en días alternos en la piel del lomo. El tratamiento continuo de la epidermis de la cola de ratón con AR induce una hiperplasia generalizada y conversión en ortoqueratótica de la piel paraqueratótica (Schweizer, 1987). El tratamiento con TPA causa hiperplasia sin alterar el patrón alternante orto y paraqueratótico característico de la cola de ratón (Schweizer, 1987). En la piel del lomo, el TPA, conocido estimulador de la actividad mitótica de la epidermis, induce un aumento en la proliferación celular y lleva a una hiperplasia generalizada de la epidermis (DiGiovanni, 1992).

La expresión del transgén en la piel de la cola y del lomo en animales no tratados queda restringida a los folículos pilosos (figura 21a y b). En la piel de la cola tratada con AR, se observa expresión del transgén a lo largo de todo el epitelio (figura 24a); los tratamientos en la piel de la cola con TPA inducen el transgén en las zonas ortoqueratóticas (figura 24b) de forma similar a la inducción del transgén bK6β-lacZ (Ramírez, 1993 ; Ramírez y cols. 1995). En la piel del lomo hiperplásica por efecto del TPA, se observa la proteína transgénica a lo largo de todo el epitelio (figura 24c).

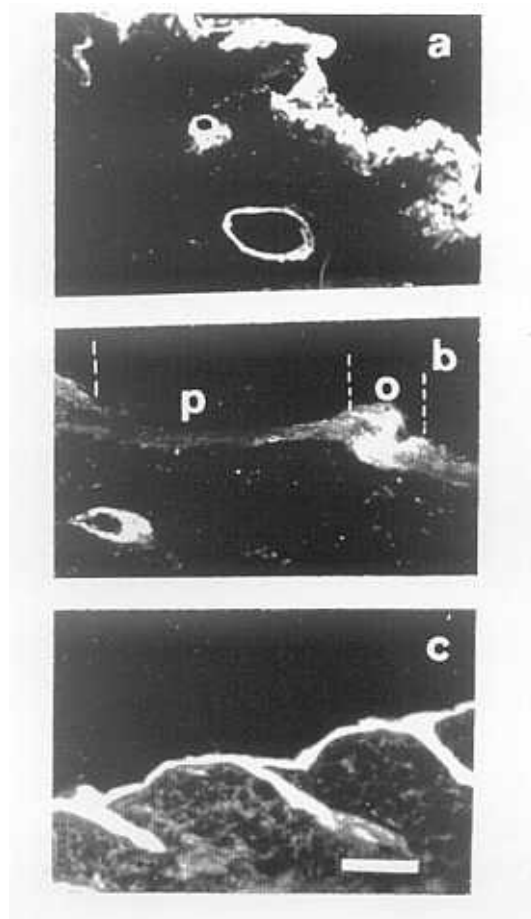


Figura 24. Expresión inducida del transgén bK6 β -hK10 mediante tratamientos con ácido retinoico en piel de cola (a) y TPA en piel de la cola (b) y piel del lomo (c). Detección de la proteína transgénica hK10 mediante inmunofluorescencias indirectas con el anticuerpo monoclonal AE2. a, b, línea 1357; c, línea 176. o: ortoqueratótico; p:paraqueratótico. Barra, 30 μ m.

Con todo ello podemos concluir que, de forma similar a lo que ocurre con la queratina endógena mK6, y en el transgén derivado de lacZ, la queratina hK10 aumenta su expresión, de forma inducible, en respuesta a diversos estímulos de origen químico. Este dato resulta de especial interés, al desarrollar protocolos de carcinogénesis química en piel de ratón con estos animales transgénicos (ver apartado 3).

3. CARCINOGENESIS DE PIEL DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN K10

Se ha desarrollado un modelo de ratones transgénicos, que es particularmente adecuado para conocer los efectos de la expresión de la queratina K10 en carcinomas de células escamosas de ratón, un tipo de tumor maligno en el que esta proteína desaparece, convirtiéndose así en un marcador de malignidad (Roop y cols. 1988). Basándonos en las características de los promotores empleados en las construcciones microinyectadas, es posible la inducción del transgén a lo largo de todo el proceso de malignización, bien en virtud de la inducibilidad de la queratina K6 en las condiciones de hiperproliferación que se dan en los tumores y por carcinógenos químicos o promotores tumorales, o por la distribución de la queratina K5 en los carcinomas de piel de ratón.

Se utilizaron ratones transgénicos F₁ hemicigotos C57BL/6xBalb/C, (o lo que es lo mismo B6CF₁) machos y hembras de las líneas bK6β-hK10 176 y bK5-hK10 825, utilizándose como controles hermanos de camada no transgénicos de cada línea. Todos los animales se sometieron a un protocolo de carcinogénesis completa a dosis muy altas de DMBA (ver Materiales y Métodos). En ningún caso se desarrollaron tumores de forma espontánea. Todos los tumores aparecieron en la piel del lomo de los animales, no desarrollándose tumores en otras localizaciones.

La tabla XI recoge la incidencia de carcinomas desarrollados en ratones transgénicos de las líneas 825 y 176: un 87.5% (14 de 16) de los transgénicos bK5-hK10 y un 66.6% (10 de 15) de los transgénicos bK6β-hK10, frente a un 73.3% (11 de 15) y un 85.7% (12 de 14) de sus hermanos no transgénicos, respectivamente, desarrollaron carcinomas epiteliales (de alguno de los estadios de la clasificación de Lever) durante las 30 semanas de seguimiento del tratamiento. La diferencia en la incidencia de tumores entre transgénicos y controles no es significativa para ninguna de las dos líneas transgénicas estudiadas (aplicando una prueba de contraste de hipótesis χ^2 con un valor de significación $P < 0.01$).

	construcción	
	bK5-hK10	bK6β-hK10
TG	14/16 (87.5 %)	10/15 (66.9 %)
NT	11/15 (73.3 %)	12/14 (85.7 %)

Tabla XI. Incidencia de carcinomas en ratones transgénicos de las líneas 825 bK5-hK10 y 176 bK6β-hK10 y en sus hermanos no transgénicos a las 30 semanas de tratamiento con DMBA. TG:transgénico; NT: no transgénico.

El momento de aparición de los carcinomas, comparando transgénicos y controles para cada línea, viene reflejado en la figura 25. En ambos casos hay un retraso en la aparición de los carcinomas en los transgénicos respecto a los controles, más acusado para el transgén bK6β-hK10, si bien todos desarrollan finalmente tumores con incidencias parecidas. El análisis estadístico (aplicación de los *tests* de Wilcoxon y Tuckey) reveló diferencias significativas en la cinética de aparición de carcinomas entre transgénicos y no transgénicos portadores de la construcción bK6β-hK10 (con valores de significación $P < 0.0004$ y $P < 0.003$ respectivamente), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los transgénicos bK5-hK10 y sus hermanos de camada. No se observa ninguna correlación entre el momento de aparición del carcinoma y el grado histológico del mismo. Los machos y hembras de ambos grupos respondieron al tratamiento de forma similar.

El número medio de carcinomas por ratón oscila siempre en torno a 1, no apreciándose grandes diferencias entre las distintas líneas, ni entre transgénicos o controles. El índice más alto (1.5 tumores por ratón), se obtuvo en los no transgénicos hermanos de camada de los bK5-hK10, y el más bajo en los no transgénicos controles para bK6β-hK10.

Se obtuvieron secciones histológicas de todos los tumores desarrollados en los ratones para su análisis, diagnóstico y clasificación. Fundamentalmente se desarrollaron carcinomas, los papilomas obtenidos fueron minoritarios, así como algún queratoacantoma u otras lesiones benignas. El estudio se centró en los carcinomas, considerados los más informativos para el objeto de nuestro estudio.

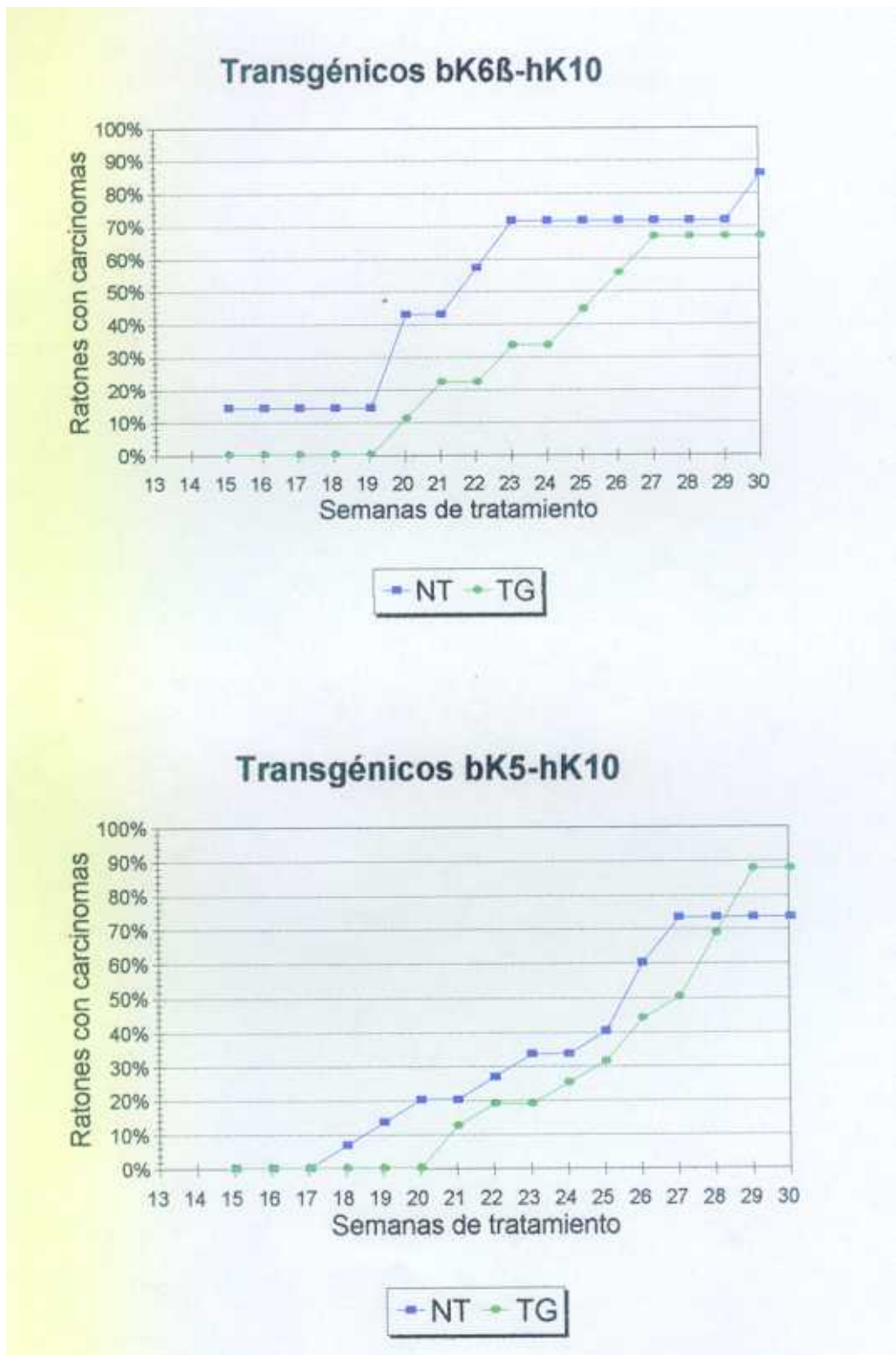


Figura 25. Momento de aparición de carcinomas en ratones transgénicos (TG), y hermanos de camada n transgénicos (NT) de las líneas bK6 β -hK10 176 (arriba), y bK5-hK10 825 (abajo) tratados con DMBA.

El análisis histológico reveló una amplia variedad de tipos histológicos de acuerdo con la clasificación de Lever (Lever y Schaumburg-Lever, 1990), tanto en los transgénicos como en los controles, tal como se refleja en la tabla XII. Tanto los ratones transgénicos bK6 β -hK10 como los hermanos no transgénicos desarrollaron una proporción mayor de tumores de grado 1 y 2 (muy diferenciados) frente a los de grado 3 y 4 (poco diferenciados); en la línea con la construcción bK5-hK10, los no transgénicos desarrollaron una proporción mayor de carcinomas diferenciados, mientras que en los transgénicos se desarrollaron proporciones similares de todos los grados histológicos.

transgén	n° ratones	n° ratones con tumores (%)	n° cc	n° medio tumores /ratón	grado histológico			
					1	2	3	4
bK5-K10	TG 16	14 (87.5)	18	1.28	5	5	5	3
	NT 15	11 (73.3)	17	1.54	8	6	1	2
bK6 β -K10	TG 15	10 (66.6)	11	1.1	2	6	2	1
	NT 14	12 (85.7)	12	1	4	6	1	0

Tabla XII. Análisis de los carcinomas epiteliales en ratones transgénicos bK5-hK10 de la línea 825 y bK6 β -hK10 de la línea 176 y hermanos no transgénicos tratados con DMBA. TG: transgénico; NT: no transgénico.

La expresión del transgén se detecta en cortes histológicos seriados por inmunohistoquímica, utilizando un conjugado de avidina-biotina peroxidasa como sistema de detección (figura 26E y 27F). Igualmente se realizan análisis inmunohistoquímicos con los anticuerpos policlonales RK1, RK5, RK6, RK13 (cedidos por el Dr. Roop) para detectar, por su interés, la expresión de otras queratinas (figuras 26 y 27):

a) queratina mK1 (reconocida por el anticuerpo RK1). Esta queratina es la pareja natural de K10 y, por lo tanto, ambas se expresan en cantidades similares. Dado que el anticuerpo RK10 utilizado para detectar hK10 transgénica también reacciona con la queratina murina, es necesario estimar la cantidad de queratina mK1 para, a través de ella, evaluar la contribución de mK10 y hK10 a la tinción obtenida con RK10. Como se observa (figuras 26D y 27E), y de acuerdo con los datos de otros autores acerca de tumores de piel de ratón obtenidos mediante protocolos de carcinogénesis química (Roop y cols., 1988; 1989), los carcinomas examinados tienen muy baja expresión de la queratina endógena mK1, y por consiguiente,

también de mK10. Por lo tanto, la tinción obtenida con RK10 en los tumores (figura 26E y 27F) se atribuye a la queratina hK10 transgénica.

b) queratinas mK5 y mK6. La distribución de estas queratinas (puesta de manifiesto con los anticuerpos RK5 y RK6, respectivamente) debe coincidir con la de hK10 en los carcinomas de ratones portadores del transgén bK5-hK10 y bK6 β -hK10, respectivamente. Como se puede comprobar (figuras 26B y C, 27C y D), y de acuerdo con la literatura existente (Roop y cols., 1989), ambas queratinas se expresan ampliamente en los carcinomas, cambiando K5 su localización basal por otra diseminada en los tumores de grado más alto (compárense las figuras 26B y 27C).

c) queratina mK13. (reconocida por el anticuerpo RK13). Se considera un marcador de progresión tumoral en la carcinogénesis de piel de ratón (Nischt y cols., 1988), siendo su expresión abundante en los papilomas pero muy escasa o ausente en carcinomas. De acuerdo con esto, la presencia de la queratina K13 era muy escasa o nula en nuestros carcinomas (figura 27B).

La queratina hK10 transgénica estaba presente en los carcinomas de animales transgénicos portadores de la construcción bK5-hK10 (figura 26E) y bK6 β -hK10 (figura 26F). Se detectó la presencia tanto de las queratinas endógenas como de la hK10 transgénica en carcinomas de grados 1 a 3, mientras que los tumores muy poco diferenciados (grado 4) han perdido la capacidad de expresar queratinas. La distribución de la queratina hK10 transgénica es coincidente con la de las queratinas endógenas mK5 y mK6, según el transgén ensayado (compárense las figuras 26E con 26C y 27F con 27D) aunque se detecta generalmente con menos intensidad y en localizaciones más restringidas que las endógenas homólogas de los promotores que dirigen su expresión.

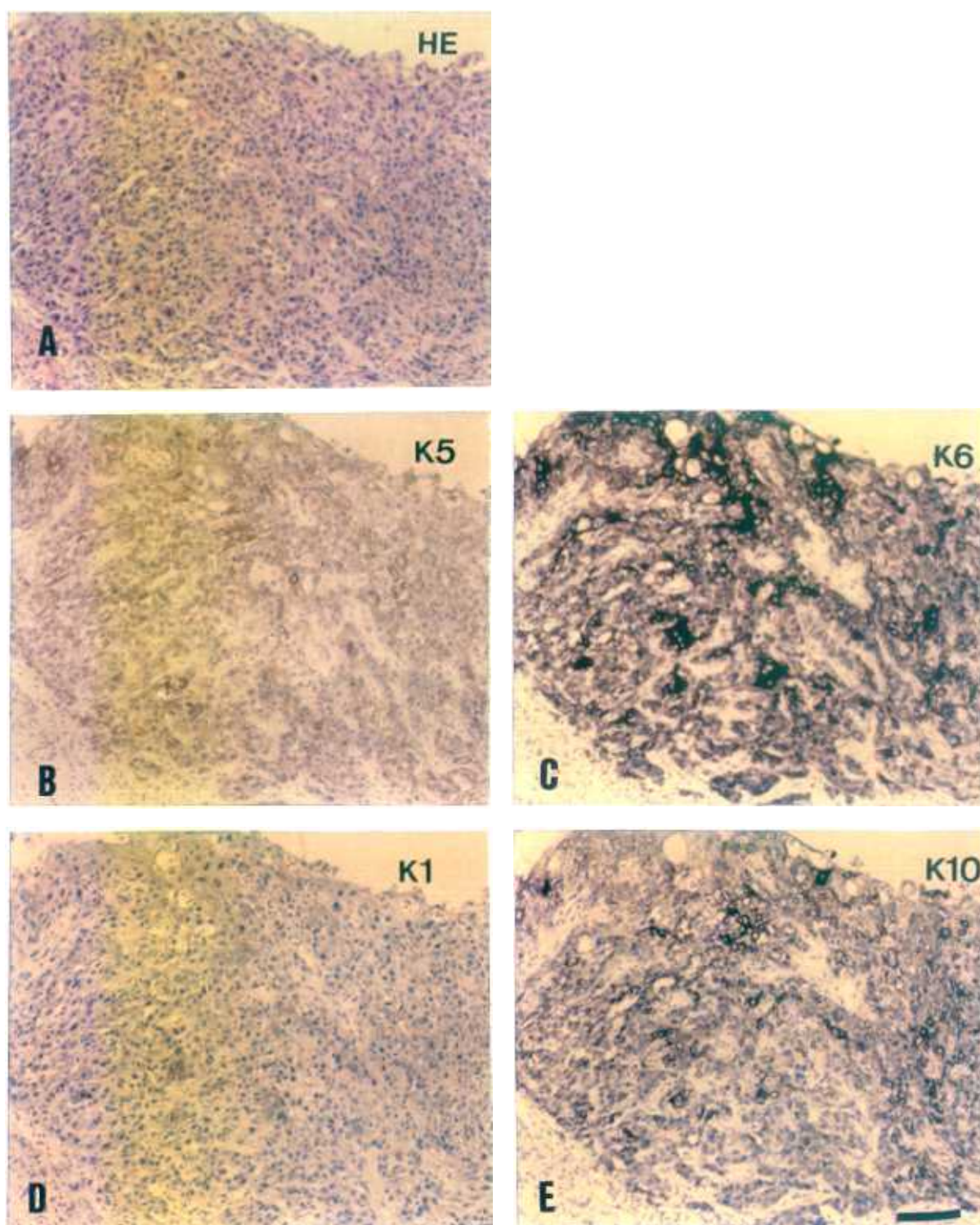


Figura 26. Histología y expresión de las queratinas K5, K6, K1 y K10 en un carcinoma escamoso-celular de grado 3 de un ratón transgénico bK5-hK10. La clasificación histológica se realizó siguiendo los criterios de Lever y Schaumburg-Lever (1990) tal como se describe en Materiales y Métodos. H.E: hematoxilina-eosina. La detección de las distintas queratinas (K5, K6, K1, K10) se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas en cortes seriados utilizando los anticuerpos policlonales RK5, RK6, RK1 y RK10 respectivamente. Barra, 13 μ m.

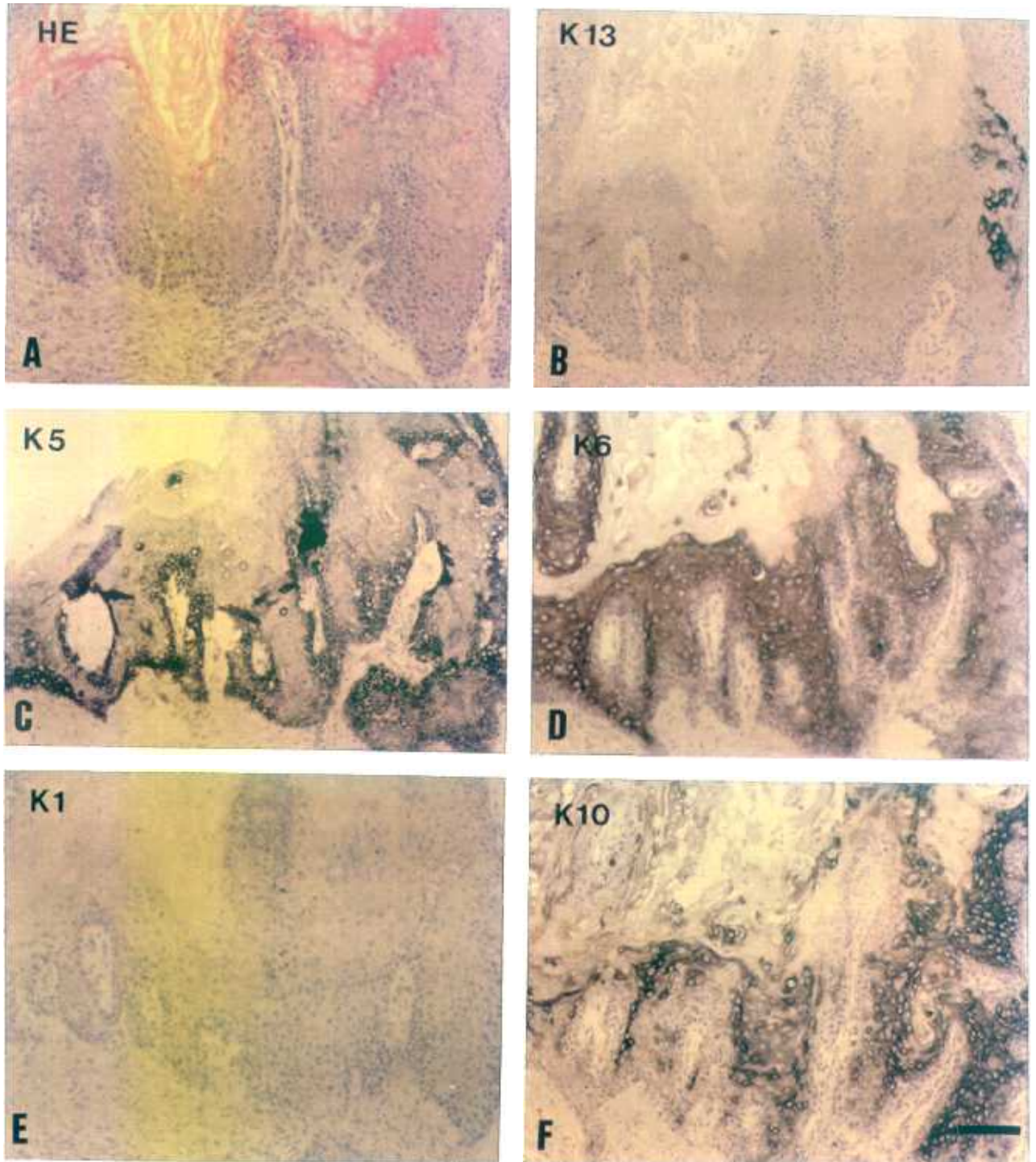


Figura 27. Histología e inmunodetección de las queratinas K13, K5, K6, K1 y K10 en un carcinoma de células escamosas celular de grado 1 de un ratón transgénico bK6β-hK10. La clasificación histológica se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos. H.E: hematoxilina-eosina. La detección de las distintas queratinas (K13, K5, K6, K1, K10) se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas en cortes seriados utilizando los anticuerpos policlonales RK13, RK5, RK6, RK1 y RK10 respectivamente. Barra, 13μm.

Para confirmar los datos aportados por la inmunohistoquímica, se analizó por *Western blot* de extractos proteicos de queratinas de tumores la presencia de la proteína transgénica. Se detectó queratina K10 sólo en los carcinomas de animales transgénicos (figura 28).

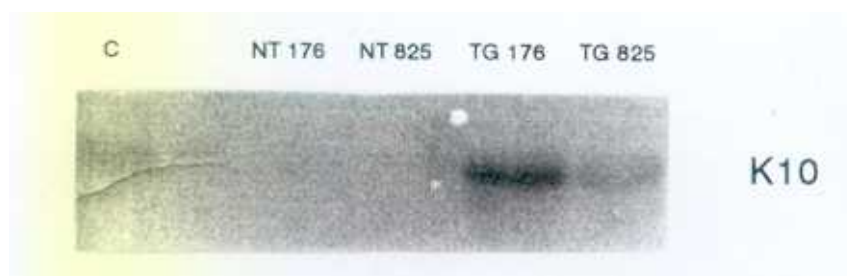


Figura 28. Análisis por *Western blot* de la expresión de la proteína K10 en carcinomas de ratones transgénicos bK5-hK10 y bK6β-hK10 y hermanos de camada tratados con DMBA. La inmunodetección de la queratina K10 se realizó con el anticuerpo RK10. En los distintos carriles se cargaron las siguientes muestras de extractos de queratinas: C: cultivos primarios de queratinocitos de ratón de una línea que expresa hk10; NT 176: ratón no transgénico de la línea 176; NT 825: ratón no transgénico hermano de camada de la línea 825; TG 176: ratón transgénico de la línea 176; TG 825: ratón transgénico de la línea 825.

Tanto los datos inmunohistoquímicos como los aportados por los *Western blots* demuestran la presencia de la queratina hK10 en los carcinomas de células escamosas de los animales transgénicos. Su presencia hasta en los estadios en que se mantienen las citoqueratinas en el citoplasma celular no parece alterar ni el número ni el grado histológico de los tumores obtenidos, sin embargo sí es responsable en los transgénicos bK6β-hK10 de un retraso significativo en el momento de aparición de los mismos. En los transgénicos bK5-hK10 no se produce este fenómeno, probablemente debido a que la cantidad de proteína transgénica expresada en estos tumores es menor que la expresada en los tumores de la construcción bK6β-hK10 (figuras 26, 27 y 28). Además, hay que tener en cuenta que, debido a su larga duración los protocolos de carcinogénesis química en piel de ratón se han realizado en líneas que portan pocas copias del transgén, lo expresan en menor cantidad que las líneas que integran un alto número de copias, y no desarrollan alteraciones fenotípicas. Debido a esto no podemos descartar que los resultados de estos experimentos no fueran diferentes en el caso de poder usarse las líneas con más alta expresión del transgén.

DISCUSIÓN

La sobreexpresión o expresión ectópica de una proteína en ratones transgénicos es una herramienta útil para el estudio de la función de la proteína ensayada. Los estudios de función pueden realizarse por ganancia de función (sobreexpresión o expresión ectópica) o por pérdida de función (expresión de formas mutadas que actúan como dominantes negativos, inactivación del gen por recombinación homóloga). A pesar de los avances ocurridos en los últimos años en el conocimiento de la(s) función(es) que desempeñan las queratinas, el conocimiento de este aspecto de estas proteínas, y del resto de los FI, es todavía limitado. La información de que disponemos en la actualidad sobre el efecto de la inactivación de una queratina epidérmica por recombinación homóloga se restringe a la queratina K14 (Lloyd y cols., 1995), y produce en los ratones transgénicos lesiones similares a las que sufren los pacientes de EBS. Por otra parte, la expresión de formas mutadas de genes de queratinas basales y suprabasales en la piel de ratones transgénicos reproduce las patologías humanas causadas por mutaciones en esos mismos genes (Vassar y cols., 1991; Fuchs y cols., 1992). Estas observaciones han sido fundamentales para establecer que la ausencia de un citoesqueleto de queratinas propiamente organizado causa fragilidad en las células epidérmicas y que, por lo tanto, estas queratinas están implicadas en conferir resistencia mecánica a este epitelio y, probablemente a otros. Sin embargo, otros datos sugieren que, a parte de esta función de tipo estructural, las queratinas podrían estar implicadas en otros tipos de funciones. Así, por ejemplo, la inactivación del gen de la queratina K8 por recombinación homóloga produce letalidad embrionaria a partir del día 12 de desarrollo debido a la falta de una adecuada función del hígado fetal como órgano hematopoyético (Baribault y cols., 1993). Por otro lado, la expresión constitutiva en piel interfolicular de cantidades relativamente bajas de la queratina K16 induce hiperproliferación en epidermis de ratones transgénicos (Takahashi y cols., 1994).

La realización de los experimentos descritos en esta memoria se decidió en función de dos tipos de argumentos:

- a) Al ser las queratinas K1 y K10 características de células suprabasales diferenciando terminalmente, su expresión forzada en tipos celulares (como las células basales, o suprabasales de epitelios internos como lengua o esófago) o en procesos (como la carcinogénesis) en los que normalmente no se expresan podría aportar información sobre la función de estas proteínas.
- b) La existencia en el laboratorio de un menú de promotores de genes de queratinas minuciosamente caracterizados en ratones transgénicos, que permitía abordar estas elaboradas manipulaciones genéticas.

Los resultados obtenidos, que se discuten a continuación, demuestran que la alteración en el patrón de expresión de estas queratinas conduce a letalidad embrionaria (total para la queratina K1 y parcial para la queratina K10) y a graves y complejos fenotipos en los animales nacidos. Estos fenotipos indican claramente que la queratina K10 está implicada en

procesos fundamentales de la función y diferenciación epiteliales y sugieren que la cuidadosa expresión diferencial de las queratinas durante la embriogénesis y en los tejidos adultos no es un mero accidente evolutivo sino que está asociada a la diversidad estructural y funcional de los tejidos epiteliales.

1. EXPRESIÓN DE LA QUERATINA K10, CARACTERÍSTICA DE ESTRATOS EPITELIALES DIFERENCIADOS POST-MITÓTICOS, EN CAPAS BASALES PROLIFERATIVAS.

En este apartado se discuten los resultados obtenidos con un modelo animal en el que se dirige la expresión de una queratina epidérmica característica de capas suprabasales (K10) al lugar de expresión de una queratina epidérmica característica de capas basales (K5). *In vivo*, la síntesis de las queratinas de capas basales y de aquellas específicas de diferenciación son fenómenos mutuamente excluyentes.

Las alteraciones observadas muestran que la expresión correcta de las proteínas que constituyen los FI de queratinas del citoesqueleto es de importancia crítica para el cumplimiento normal de la función de determinados tipos celulares. Este hecho está en concordancia con otras observaciones en que alteraciones en el programa de expresión normal de queratinas tienen como resultado alteraciones en las funciones celulares de los tejidos donde se expresan en ratones transgénicos: Así, la expresión ectópica de la queratina hK1 (pero no hK10) en las células β de páncreas conduce a una forma de diabetes. En estos ratones hK10 se aloja en las células pancreáticas y es compatible con la función celular, mientras que los ratones que expresan hK1 sola o en combinación con hK10 desarrollan una forma de diabetes debido a la reducción en el tiempo de vida de las células β , y la disminución de su función secretora de insulina (Blessing y cols., 1993). La sobreexpresión de la queratina K8 humana tiene efectos fisiopatológicos: los ratones transgénicos que integran un alto número de copias del transgén, y por tanto expresan elevadas cantidades de proteína humana presentan un fenotipo de pequeño tamaño y pelo erizado, alteraciones en la hipófisis y disfunción pancreática (Casanova, 1994; Casanova y cols., 1995). La anteriormente mencionada sobreexpresión de hK16 tiene como consecuencia la queratinización aberrante de la VRE y epidermis proximal, hiperproliferación, acantosis e hiperqueratosis (Takahashi y cols., 1994). La expresión ectópica de la queratina epidérmica hK14 en hepatocitos provoca una alteración de la red de filamentos endógenos de K8/K18, conduce a acumulación de glucógeno y produce lesiones histopatológicas en el hígado (Albers y cols., 1995). Estos resultados obtenidos *in vivo*, contrastan con estudios anteriores en los que la expresión de queratinas en cultivos celulares no altera la morfología o supervivencia celular (Albers y Fuchs 1987, 1989; Doumenjoud y cols., 1988,; Kulesh y Oshima, 1988; Lersch y cols.,

1989; Blessing y cols., 1989; Lu y Lane, 1990; Bader y cols., 1991). Dadas las limitaciones de los cultivos celulares para abordar el estudio de la función de las queratinas, recalcamos la necesidad del uso de ratones transgénicos para poder cumplir estos objetivos.

A diferencia de otros trabajos en los que el análisis ultraestructural de la sobreexpresión o expresión ectópica de queratinas en ratones transgénicos revela alteraciones en la red de FI de queratinas (Blessing y cols. (1993), describen la presencia de haces de filamentos en el citoplasma y en el núcleo de las células β del páncreas, con frecuencia en el caso de hK1 y, muy raras veces en el caso de hK10; Takahashi y cols. (1994) observan en la epidermis lesionada por la presencia de hK16 una desorganización de la red de FI, presencia de pequeños agregados de queratinas y ausencia de anclaje de filamentos a desmosomas; Albers y cols. (1995) describen en los hepatocitos portadores de hK14 la acumulación de glucógeno, formación de estructuras similares a agregados de queratinas y en algunos casos rompimiento de la red de queratinas y pérdida de los filamentos del citoplasma), o las mutaciones en genes de queratinas causantes de determinadas patologías caracterizadas por queratinocitos con alteraciones ultraestructurales en las redes de los filamentos que los forman (redes de FI desorganizadas, estructural y funcionalmente defectuosas; revisado en Fuchs, 1994; Anton-Lamprecht, 1994), no hemos encontrado alteraciones en la red de los filamentos de queratinas en la piel del lomo de ratones transgénicos con alteraciones fenotípicas. Si bien los estudios ultraestructurales son todavía muy preliminares, es posible que la acumulación de la proteína que se expresa de forma ectópica (hK10) en las células en las que se expresa (células del estrato germinativo), conduzca a alteraciones en la estructura celular y en la función aunque no se hayan encontrado alteraciones en la red de FI. Un análisis más detallado de la ultraestructura en otros órganos en los que se expresa K10 en capas basales o de forma genuinamente ectópica (en ausencia de expresión de mK5), aportará más datos sobre las redes de FI de queratinas en las células que expresan la proteína transgénica y su relación con los fenotipos observados, si es que la hubiere.

1.1. Posible papel de la queratina K10 en la diferenciación de epitelios estratificados

En este trabajo se muestra un modelo animal de ratones transgénicos en el que la expresión ectópica de una queratina epidérmica, característica de capas suprabasales, en capas basales de epidermis (y otros epitelios) altera el programa normal de la diferenciación epitelial y conduce a diversas anomalías histopatológicas y funcionales en varios tejidos. Aunque desconocemos las bases moleculares y/o los mecanismos celulares que las provocan, los resultados indican que existe una relación entre la cantidad de proteína expresada y la severidad fenotípica observada.

Se observa en la piel del lomo de los ratones transgénicos bK5-hK10 que integran un alto número de copias una amplia proporción de queratinocitos basales con rasgos típicos de células diferenciadas (morfología de células muy aplanadas, de aspecto escamoso, incluso fusiformes), presentando esta piel una marcada hiperqueratosis ortoqueratótica (aumento excesivo de la capa córnea acelular), asociada a una atrofia del resto del estrato espinoso y ausencia del estrato granuloso (figura 14b, d); en los epitelios internos (esófago, estómago), se observa un importante engrosamiento de los estratos lúcidos. De estos datos se infiere que en estos epitelios que expresan la queratina K10 transgénica en las capas basales (figura 8a, f, g), se produce un fuerte aumento del estrato córneo (estrato de la epidermis característico de la diferenciación terminal), o del estrato lúcido (estrato diferenciado propio de áreas muy queratinizadas) sin que haya, en la piel del lomo, un estrato granuloso intermedio; lo que sugiere un tránsito muy rápido de la célula basal, que expresa la K10 transgénica, a las capas más diferenciadas de los epitelios. En estos epitelios no se observa ninguna alteración en la expresión de otras queratinas epidérmicas endógenas (no mostrado), por lo que las alteraciones observadas en la diferenciación ocasionadas por la presencia de la queratina transgénica hK10 en capas basales no interfieren en la síntesis y expresión de otras queratinas. Aun siendo preliminares, los análisis ultraestructurales confirman lo observado con la microscopía óptica (ausencia de gránulos de queratohialina y de un estrato granuloso). Presumiblemente, la presencia de la queratina transgénica hK10 en las capas basales de epidermis transmite una señal a las células que la expresan que las hace diferenciarse de forma acelerada, sin apenas un tránsito en los estratos intermedios de la epidermis, sugiriendo para la queratina K10 un papel activo en la diferenciación epidérmica.

Durante el crecimiento y regeneración de la epidermis una gran proporción de células basales proliferan en respuesta a una serie de factores de crecimiento (tales como el TGF α entre otros muchos, véase Introducción). A medida que estas células se diferencian, la producción de otros factores por las células suprabasales, como los miembros de la familia del TGF- β , podría bloquear la proliferación e inducir la diferenciación de las células basales. De esta forma se mantendría el equilibrio entre los compartimientos proliferativos y en diferenciación de la epidermis. (Fuchs, 1990; Drozdoff y cols., 1994). La presencia de la queratina K10 en las capas basales no parece bloquear la proliferación en el estrato germinativo (figura 16), y sin embargo sí parece responsable del grado de diferenciación de los epitelios en que se expresa, sugiriendo un papel importante en la diferenciación. La expresión de K10 en las células basales podría estimular la secuencia de procesos que determinan la diferenciación epidérmica desde las células en que se está expresando.

Curiosamente el efecto fenotípico observado en los ratones se hace patente en la epidermis que recubre el cuerpo de los animales, siendo la piel de cola y piel plantar histológicamente normales. Desconocemos las razones que subyacen a esta especificidad

relativa. Probablemente sea debido a que existen diferencias entre estos tipos de piel: diferencias histológicas (número de capas celulares que los conforman, número y tipo de glándulas, presencia de folículos pilosos en distinta proporción), diferentes tipos de queratinización, expresión diferencial de algunas queratinas, etc. En la epidermis, el proceso de diferenciación epidérmica es responsable del mayor o menor grado de queratinización, cuya función reconocida es la formación de un estrato córneo protector frente a una gran variedad de agentes, incluyendo microorganismos patógenos, erosiones externas y agentes químicos nocivos. Así, un engrosamiento del estrato córneo forma parte del mecanismo de defensa natural de la epidermis, particularmente en condiciones en las que esta barrera corre peligro, tales como heridas, infecciones, o enfermedades de la piel en las que el programa de diferenciación se ha alterado.

1.2. ¿Es realmente el fenotipo debido a la expresión del transgén?

Los animales portadores de un número elevado de copias del transgén bK5-hK10 presentan múltiples lesiones, que afectan de forma severa a diversos tejidos y órganos, algunas de las cuales se caracterizan por su gran complejidad. Podemos considerar que estas lesiones se producen como consecuencia de la expresión de hK10 ya que diferentes líneas de ratones transgénicos bK5-hK10 muestran el mismo fenotipo; sin embargo en algunos de los tejidos analizados no se ha encontrado una correlación directa entre la expresión del transgén y la lesión observada, es decir, se han observado lesiones graves en tejidos en los que no se ha detectado expresión del transgén (médula espinal, células sanguíneas) y viceversa, tejidos con expresión genuinamente ectópica de la proteína transgénica (alveolos pulmonares, tubos colectores renales) que no manifiestan alteraciones morfológicas. Probablemente el desarrollo simultáneo de varias y tan complejas alteraciones fenotípicas y funcionales, con múltiples patologías asociadas, no son solamente el resultado de la presencia de un gen extraño. Aunque en el momento actual no podemos explicar todos los mecanismos que desencadenan estas manifestaciones patológicas, en este apartado intentamos relacionar las lesiones observadas, la presencia del transgén y las manifestaciones clínicas que presentan los transgénicos bK5-hK10.

Exteriormente se reconoce a los ratones transgénicos bK5-hK10 por su pequeño tamaño, temblor fino, y paresia que afecta principalmente a las extremidades posteriores.

Es posible que la hiperqueratosis observada en el estómago aglandular no permita el correcto procesamiento del alimento durante la digestión y contribuya al pequeño tamaño observado en los ratones transgénicos, lo que, asociado a la deficiencia inmunológica que presentan, responsable de una mayor susceptibilidad a las infecciones, pueda determinar un retraso en el crecimiento.

La fuerte expresión de la queratina K10 observada en las células reticulares del timo (figura 9b), tanto en la región cortical como medular, presumiblemente impide la preservación adecuada de los linfocitos T en el timo (figura 14l) a la espera de su salida a sangre circulante para adquirir la inmunocompetencia, siendo fagocitadas de forma prematura por los macrófagos. En el timo normal, la gran mayoría de la población celular de la región cortical está formada por linfocitos (figura 14k). Las células reticulares corticales sostienen y protegen los linfocitos que proliferan y se diferencian en esta localización histológica, donde están protegidos de la influencia de las macromoléculas circundantes, lo que constituye la base estructural de la barrera hematotímica para los antígenos. La depleción de linfocitos observada en el timo de los ratones transgénicos podría ser la consecuencia de una alteración en la barrera hematotímica por la expresión ectópica de hK10 en las células reticulares, llevando a la degeneración de los linfocitos antes de su diferenciación. La linfocitopenia resultante conduce a un estado de inmunodepresión en los transgénicos bK5-hK10 que les hace especialmente vulnerables frente a agentes patógenos externos, lo que explicaría los casos encontrados de encefalitis y las muertes por goteo irregular, todas ellas producidas en edades muy jóvenes. Asimismo la falta de linfocitos T circulantes, de forma indirecta, determina una disminución de los linfocitos B, ya que estos últimos requieren de la participación cooperativa de los linfocitos T para llevar a cabo la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos.

Por otro lado, se ha observado en muchos de los transgénicos analizados gangrena seca como consecuencia de una trombosis múltiple en la circulación terminal de órganos distales como las orejas (figura 14h). Una de las causas que podría explicar esta lesión sería un proceso de coagulación intravascular diseminada o lesiones en la pared vascular. En cualquier caso es muy probable que a su vez, estas alteraciones circulatorias sean responsables de los trastornos nerviosos y motores observados en los transgénicos bK5-hK10. La formación de trombos muy posiblemente tenga su causa en la deshidratación de los individuos a través de la piel tan fina. A este respecto hemos de señalar que los animales presentan rasgos clínicos de deshidratación grave, aunque por el momento no se ha realizado un *test* de coagulación, ni se ha evaluado la pérdida de agua a través de la barrera epidérmica.

La degeneración de neuronas motoras observada en la médula espinal (figura 14d), tiene probablemente su origen en la isquemia debida a los problemas en la vascularización sanguínea. Secundariamente esta degeneración neuronal sería responsable de la degeneración observada en los nervios (ciático) y la consiguiente falta del desarrollo muscular, lo que explicaría la paresia y los trastornos motores que distinguen a los ratones transgénicos de sus hermanos de camada.

Los plexos coroideos intervienen en la síntesis y renovación constante del líquido cefalorraquídeo cuya misión es la protección del sistema nervioso frente a contusiones y lesiones mecánicas, siendo importante para su metabolismo. Los gránulos de queratina transgénica observados en el revestimiento epitelial de los plexos coroideos (figura 9f), probablemente impidan su desarrollo (figura 14l) e interfieran en la correcta realización de sus funciones. En este caso la expresión de una queratina de tipo I, en gran exceso en relación a queratina endógena de tipo II, produce una agregación de proteína que interfiere con la organización normal de los FI.

Se ha mencionado la hipertrofia observada en los acinos pancreáticos que rodean a los islotes de Langerhans (figura 14b), la región mejor vascularizada del páncreas. Posiblemente la presencia de la proteína transgénica hK10 induzca hiperactividad en las células acinares, y se manifieste solamente alrededor de los islotes debido a que los problemas en la vascularización ya mencionados que presentan los animales transgénicos dificultan el aporte sanguíneo en los acinos más alejados de los islotes. Los ratones transgénicos bK5-hK10 presentan expresión del transgén exclusivamente en el páncreas exocrino (en pequeños conductos de secreción y células secretoras), sin que se haya observado expresión o alteración morfológica en los islotes de Langerhans. Blessing y cols., (1993) describen una forma de diabetes caracterizada por una reducción en el número de vesículas secretoras de insulina en ratones transgénicos que expresan la queratina hK1 (sola o en combinación con su pareja hK10) en células pancreáticas. Sorprendentemente este efecto es específico de la queratina hK1, ya que hK10 por sí sola no lo produce; en este trabajo se describen múltiples alteraciones en varios órganos, originados por la expresión de la queratina hK10 como único transgén.

Podemos enumerar algunos epitelios simples en los que la proteína transgénica se expresa de forma ectópica sin que se hayan observado alteraciones morfológicas en los órganos que los constituyen (estómago glandular, pulmón, hígado o riñón). En estas localizaciones se ha detectado colocalización de la proteína transgénica hK10 con la queratina endógena mK8, por lo que presumiblemente el producto del transgén se ha integrado en el citoesqueleto formando filamentos con K8 sin alterar la función normal de estos órganos.

De los resultados obtenidos, podemos concluir que se necesita un nivel mínimo de expresión de la queratina hK10 transgénica para producir efectos sobre la fisiología, ya que los ratones que han integrado un número bajo de copias y expresan el transgén en menor cantidad (es el caso de las líneas 665 y 825) se desarrollan con normalidad. A pesar de ello, la cantidad de proteína transgénica suficiente para producir un fenotipo muy grave en los animales no debe ser muy alta, comparada con los niveles de queratinas endógenas, ya que no se ha podido visualizar el producto del transgén en geles de proteínas teñidos con azul de

Coomasie (resultados no mostrados).

Es posible que las líneas de ratones transgénicos aquí analizadas sean una excepción, y se trate de aquellos animales que, por razones que desconocemos, escapan a la muerte, ya que los resultados reflejados en la tabla VII nos permiten deducir que un número elevado de copias funcionales del transgén podrían ser letales durante el período embrionario, de la misma forma que un porcentaje de los ratones que tienen inactivado el gen de la queratina K8 escapan al defecto embrionario y sobreviven al nacimiento (Baribault y cols., 1993).

1.3. Expresión genuinamente ectópica

El análisis de otros tejidos en los que normalmente el promotor es inactivo, (tablas III y IV) revela evidencia adicional de que la proteína hK10 transgénica se regula adecuadamente en los ratones transgénicos en las líneas con bajo número de copias y expresión moderada, no cumpliéndose este hecho en las líneas que han integrado un número mayor de copias, expresan mayores cantidades del transgén y presentan alteraciones fenotípicas. La reproducibilidad de los datos de esta expresión genuinamente ectópica (fuera de los lugares de expresión del gen endógeno mK5) en tres líneas de ratones transgénicos hace fácilmente descartable la posibilidad de que la expresión se deba a un efecto de posición reflejando la acción de algún elemento actuando en *cis* en el sitio de integración.

La expresión genuinamente ectópica en los transgenes de alto número de copias podría corresponder a localizaciones con bajos niveles de expresión de la queratina mk5; desconocemos si la expresión del transgén en tejidos en los que el promotor es inactivo es promiscua o si niveles muy bajos de expresión de la queratina K5 tienen lugar en estos tejidos o en algunas de las células que los conforman, como se ha descrito para la expresión ectópica de la queratina K8 (Casanova y cols., 1995).

Alternativamente, la ausencia de determinados elementos de control en la secuencia de bK5 ensayada, tales como silenciadores que queden fuera de las 5.2 Kb de bK5, podría explicar la expresión ectópica observada en las líneas que manifiestan alteraciones fenotípicas.

Por otra parte el fenómeno de la expresión genuinamente ectópica es relativamente frecuente en ratones transgénicos. Así, se han descrito "nuevos" patrones de expresión en tejidos u órganos fuera del control del promotor: Behringer y cols., (1988) explican la expresión ectópica fuera de los lugares de expresión del gen endógeno correspondiente al promotor debido a la generación de nuevos elementos reguladores por la yuxtaposición de las secuencias del promotor y el gen. Los ratones transgénicos en los que el factor de la hormona

de crecimiento 1 dirige la expresión del antígeno T, expresan el transgén en los tumores de intestino pero no en el tejido adyacente no tumoral; los autores sugieren que sólo una población de células está afectada (Lew y cols., 1993). Keough y cols., (1995) describen la expresión no folicular del antígeno T en ratones transgénicos en los que este gen se encuentra bajo el control de un promotor de una queratina de pelo, probablemente debido a la ausencia de elementos reguladores en las secuencias utilizadas para dirigir expresión.

2. EXPRESIÓN ECTÓPICA DE LA QUERATINA K10 EPIDÉRMICA BAJO EL CONTROL DE K6

2.1. La expresión de la queratina 10 humana bajo el control de bK6 β produce alteraciones en diversos epitelios

En este apartado de la presente memoria se discuten los resultados obtenidos con los ratones transgénicos en los que se dirige la expresión de la queratina K10 humana, característica de la diferenciación epidérmica y de expresión circunscrita a células postmitóticas, bajo el control de la queratina bK6 β , de expresión constitutiva restringida a ciertas localizaciones como lengua, paladar, epitelio oral y VRE de folículos pilosos. Los resultados obtenidos revelan que tanto en la piel como en otros tejidos epiteliales de los ratones transgénicos examinados, el gen de la queratina K10 humana bajo el control de bK6 β , se regula adecuadamente (figura 21) en las líneas que han integrado un número de copias moderado del transgén. En estas líneas no se detecta ninguna lesión, ni alteración en los tejidos analizados con expresión del transgén. Sin embargo, en contraste con esto, los ratones transgénicos que han integrado un número mayor de copias del transgén se identifican por la presencia de lesiones epiteliales caracterizadas por una hiperplasia de las capas suprabasales del epitelio, seguidos de degeneración y necrosis, que se manifiestan principalmente en la región oral.

Las lesiones son coincidentes con la expresión de la hK10 transgénica, y se localizan en las áreas en las que el gen endógeno homólogo del promotor (mK6) se expresa de forma constitutiva (Schweizer, 1992), tales como epitelio lingual, del paladar, gingival o del estómago, y sólo de forma genuinamente ectópica se ha encontrado expresión del transgén, y también lesión que se manifiesta por hiperqueratosis, en la epidermis interfolicular de la piel del lomo.

Dado que la queratina K6 se induce en determinadas condiciones (Weiss y cols., 1984), que incluyen estímulos mecánicos, o incluso la propia hiperproliferación del epitelio lesionado que expresa el transgén, el crecimiento progresivo observado en las lesiones es

consistente con la inducción de la expresión de la queratina mK6, y de forma concomitante en los ratones transgénicos, de la queratina hK10. La presencia de esta proteína anómala en cantidades no tolerables para el funcionamiento normal del epitelio es la responsable de los trastornos observados, que tienen como consecuencia la degeneración epitelial. La severidad del fenotipo, que se correlaciona con importantes cambios histológicos que afectan a la arquitectura del tejido, viene determinada por el número de copias del transgén integrado.

En los recién nacidos bK6 β -hK10 portadores de un número alto de copias del transgén, la alta tasa de proliferación (observada en forma de hiperplasia) y la expresión de la queratina K10, presumiblemente conducen a la formación de la leucoplasia, degeneración del epitelio y posterior necrosis en lengua, paladar y epitelio gingival, así como a hiperqueratosis en piel y estómago, alteraciones siempre coincidentes con la expresión de queratina K10 transgénica.

Es interesante destacar la coincidencia en varias de las lesiones que presentan los pacientes diagnosticados de paquioniquia congénita (PC) y los ratones bK6 β -hK10. Los individuos con PC (enfermedad originada por mutaciones en las queratinas K6, K16 y K17 (Bowden y cols., 1995; McLean y cols., 1995) presentan leucoqueratosis orales, moderada hiperqueratosis y acantosis en la epidermis plantar, con un estrato lúcido prominente, y reducción en zonas de la capa granular; asimismo también pueden observarse anomalías en los dientes al nacimiento. Al igual que ocurre en los recién nacidos bK6 β -hK10, en los individuos con PC hay una relación entre la agresión física recibida y el desarrollo de las lesiones. Presumiblemente, en estos individuos la expresión de grandes cantidades de formas mutadas de K6 o K16, es responsable de las lesiones. Sin embargo, con los datos de que disponemos en la actualidad no podemos concluir que la mutación de las queratinas hK16 y hK17 y la expresión ectópica de la queratina hK10 dirigida por el promotor bK6 β tengan los mismos efectos para los individuos que portan la mutación o el transgén.

La epidermis interfolicular de los recién nacidos transgénicos que integran un alto número de copias expresa de forma continua la proteína transgénica hK10 (figura 22g), mientras que sólo una parte de las células basales de epidermis expresa la queratina K6. Esta expresión aparentemente discordante podría explicarse teniendo en cuenta que la epidermis en ratones recién nacidos es hiperplásica, por lo que el promotor del transgén podría ser activo en este momento. Por otro lado, se ha descrito que la queratina K6 se regula a niveles de la transcripción y la traducción (Tyner y Fuchs 1986), por lo que cabe la posibilidad de que algún factor implicado en la represión del gen o ARNm de K6 fuera insuficiente en estos transgenes de alto número de copias, conduciendo así a una expresión inadecuada, que estamos dando en llamar genuinamente ectópica (fuera de los lugares de expresión correspondientes al gen endógeno mK6), en la epidermis interfolicular.

Los datos obtenidos tanto de la expresión de hK10 en capas basales, como dirigida por el promotor de bK6 β (hacia capas suprabasales) proporcionan dos buenos ejemplos para demostrar que la síntesis de una queratina "equivocada" y "en grandes cantidades" tiene como resultado serias anomalías (funcionales), y ponen de manifiesto la gran sensibilidad de las células epiteliales a alteraciones en el programa normal de diferenciación terminal. De forma implícita a la estrecha correlación entre la expresión de queratinas y la diferenciación epidérmica se encuentra la importancia fundamental de la expresión específica de los FI en la función de los tejidos.

3. ¿SON LAS QUERATINAS INTERCAMBIABLES?

El significado funcional de la multiplicidad de las queratinas no se ha resuelto. Las propiedades de ensamblaje de los pares de queratinas difieren, como también las interacciones con las proteínas asociadas. Los miembros de la familia de proteínas de las queratinas se expresan siguiendo patrones característicos muy específicos, tanto a nivel celular, tisular, a nivel de órgano o durante la embriogénesis. Esta compleja regulación nos hace preguntarnos si los miembros individuales de la familia de las queratinas son funcionalmente específicos o intercambiables. Los resultados obtenidos con los experimentos realizados en este trabajo, en los que la expresión en la piel de ratones transgénicos de una queratina epidérmica (hK10) produce alteraciones epidérmicas severas nos permitiría concluir que las queratinas son proteínas muy específicas, no intercambiables desde el punto de vista funcional. Este argumento vendría apoyado por los trabajos de Powell y Rogers, (1990) en los que la sobreexpresión de una queratina de pelo de oveja produce pelo frágil con ciclos de caída y nuevo crecimiento; Takahashi y cols., (1994) en los que la sobreexpresión de hK16 produce lesiones epidérmicas, y Casanova (1994), que describe efectos fisiopatológicos en ratones transgénicos como consecuencia de la sobreexpresión de hK8.

4. EXPRESIÓN FORZADA DE QUERATINA K10 EN CARCINOMAS EPITELIALES DE RATÓN

La capacidad de dirigir la expresión de proteínas de interés a epidermis en ratones transgénicos ha aumentado la posibilidad de generar modelos *in vivo* para analizar minuciosamente los mecanismos moleculares que subyacen a la diferenciación y carcinogénesis; los ratones transgénicos bK5-hK10 y bK6 β -hK10 constituyen un modelo experimental en el que virtualmente la expresión de la queratina K10 se mantiene durante el proceso completo del desarrollo tumoral, dadas la características de los promotores que

dirigen su expresión.

Se ha sugerido la existencia de al menos dos poblaciones diferentes de células durante los estadios iniciales de la carcinogénesis que dan lugar a diferentes poblaciones de papilomas (Hennings y cols., 1985); los papilomas de alto y bajo riesgo se pueden distinguir por la presencia/ausencia de una serie de marcadores fenotípicos (Glick y cols., 1993; Tennenbaum y cols., 1993; Yuspa, 1994; Sundberg y cols., 1994). Los papilomas de bajo riesgo presentan las queratinas suprabasales características de la diferenciación, mientras que los de alto riesgo se distinguen por la ausencia de las mismas, utilizándose así su presencia/ausencia como marcador de malignidad que correlaciona la pérdida de estas queratinas con la progresión a la malignización. Iniciamos estos estudios con el propósito de comprender el significado funcional de los cambios notables que ocurren en la expresión de queratinas durante la diferenciación epidérmica y en los distintos estadios de la carcinogénesis. Se desconoce el significado del dramático descenso que sufren las queratinas K1 y K10 en la conversión de papilomas benignos a carcinomas, y de ahí el interés de establecer si la expresión forzada de la queratina K10 pudiera tener algún efecto (inhibidor) sobre el desarrollo de la progresión tumoral. Si bien nuestros datos demuestran que para los transgenes ensayados (ratones bK5-hK10 y bK6 β -hK10 portadores de un bajo número de copias del transgén) la expresión forzada de la queratina K10 en carcinomas no impide su desarrollo final, sí es capaz de retrasarlo significativamente.

Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de la queratina hK10 en los carcinomas de células escamosas de los animales transgénicos no parece alterar ni el número ni el grado histológico de los tumores obtenidos (se han obtenido carcinomas con incidencias finales parecidas tanto en transgénicos como en controles hermanos de camada; sin embargo sí se observa en los transgénicos bK6 β -hK10 un retraso significativo en el momento de aparición de los mismos. Tanto los datos inmunohistoquímicos como el análisis por *Western blot* revelan una expresión moderada de las proteínas mK5 y hK10 en los tumores de ratones transgénicos bK5-hK10, obteniéndose niveles de expresión más elevados para mK6 y hK10 en la línea bK6 β -hK10 (figuras 26, 27 y 28). Es posible que estos datos pongan de manifiesto la necesidad de unos niveles mínimos de proteína transgénica para tener un efecto sobre la progresión tumoral: en los transgénicos bK5-hK10 no se produce este fenómeno, probablemente debido a que no alcanzan estos niveles mínimos de expresión del transgén.

A este respecto, no podemos obviar que dada la duración de los protocolos de carcinogénesis y la escasa viabilidad de los animales portadores de un número alto de copias para ambos transgenes, estos experimentos de carcinogénesis se han realizado con líneas de animales transgénicos portadoras de un número bajo de copias en los que la expresión del transgén es menor que en las líneas que integran un alto número de copias, y no desarrollan

alteraciones fenotípicas. Por ello, no podemos descartar resultados diferentes en el caso de poder usarse las líneas con más alta expresión del transgén. Proponemos el establecimiento de líneas de queratinocitos de animales portadores de un alto número de copias, su transformación con el oncogén v-ras^{Ha} y su inyección a ratones desnudos para seguir el desarrollo tumoral.

Las áreas de los tumores que expresan la queratina hK10 transgénica corresponden a la de las queratinas endógenas mK5 y mK6, según el transgén ensayado (aunque no necesariamente sean las mismas células, ya que el análisis inmunohistoquímico se realizó en cortes seriados, sí se trata siempre de células muy próximas; compárense las figuras 26E con 26C y 27F con 27D). La localización de la queratina hK10 en el área tumoral no parece ser un factor determinante en el desarrollo del carcinoma, sino más bien la cantidad de proteína hK10 expresada ya los diferentes resultados obtenidos para la expresión de hK10 en carcinomas, según que el promotor ensayado sea bK5 o bK6 β parecen estar en consonancia más con un efecto de cantidad del transgén que de localización del mismo.

Los carcinomas se han desarrollado usando los protocolos de carcinogénesis química completa que consistían en dosis muy altas de DMBA dada la resistencia al carcinógeno de las cepas de ratón utilizadas, que por tratarse de ratones transgénicos, habían de ser necesariamente híbridas. Al parecer, una sola dosis alta de carcinógeno genera tal toxicidad en las células blanco que no desarrollan tumores (Iversen, 1991) mientras que la aplicación de múltiples dosis de un carcinógeno aumenta su eficacia en términos de producción de carcinomas, respecto a la misma cantidad en una sola dosis. Esta cifra se ve mejorada si los intervalos se distancian (una dosis cada dos semanas en vez de dos dosis por semana).

5. AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE LA QUERATINA K1. POSIBLE EFECTO DELETÉREO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Como queda reflejado en los apartados 1.6 y 2.6, no hemos detectado expresión del gen de la queratina hK1 en ninguna de las líneas de ratones transgénicos portadores tanto de la construcción bK5-hK1, como bK6 β -hK1 por distintas aproximaciones experimentales: análisis por inmunofluorescencias indirectas con anticuerpos específicos, análisis del ARN por *Northern blot*, detección de la proteína transgénica en cultivos de queratinocitos primarios por inmunofluorescencias indirectas o inmunoperoxidasas, etc... Tampoco se observó la presencia de hK1 en dobles transgénicos bK6 β -hK1/10. La detección de la proteína hK1 en ratones transgénicos se ha realizado en otros trabajos, mediante inmunofluorescencias indirectas (Blessing y cols., 1993; Chung y cols., 1994), usando anticuerpos incluidos en nuestro trabajo.

Es difícil pensar que en todos los casos analizados no se detecte expresión debido a fenómenos poco habituales como que el transgén se haya integrado entre elementos silenciadores (Palmiter y Brinster, 1986), o que la ausencia de expresión se deba a que el transgén haya sufrido modificaciones en el estado de la cromatina (Henikoff, 1990; Neznanov y Oshima, 1993).

Lloyd y cols., 1995, que no detectan expresión por ARN ni proteína en los transgénicos K14-vimentina consideran que el promotor de K14 es incapaz de dirigir expresión. Este argumento no es aplicable a los promotores de bK5 y bK6 β , dados los resultados obtenidos para los transgenes bK5-hK10 y bK6 β -hK10 y los de Murillas y cols., (1995), que utilizan el promotor de bK5 para dirigir expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

Encontrar las razones que expliquen la ausencia de expresión del gen de la queratina K1 en la (in)capacidad de las secuencias ensayadas en los transgenes para dirigir expresión parece improbable. El conjunto de los datos obtenidos, sugiere más bien que los transgenes tengan un efecto letal para el desarrollo embrionario del individuo, argumento que se consolida con los resultados obtenidos al interrumpir las gestaciones de las hembras transferidas con la construcción bK6 β -hK1 (ver tabla X), donde se demuestra que hay un decrecimiento progresivo en el número de embriones transgénicos durante la embriogénesis a partir del momento en que se activan los promotores usados.

La revisión de Copp sobre las principales causas de letalidad embrionaria (Copp 1995) resalta los defectos en la implantación, fallos en la circulación sanguínea y/o en la hematopoyesis, o la incapacidad del embrión de derivar a sí mismo la nutrición de la madre, como los problemas derivados de la transgénesis que con más frecuencia llevan a la letalidad embrionaria. Se ha observado letalidad en múltiples transgenes que cumplen funciones tan diversas como el gen de la apolipoproteína B (Farese y cols., 1995), enfermedad de Huntington (Nassir y cols., 1995), N-acetilglucosaminiltransferasa I (Ioffe y Stanley, 1994), el factor de transcripción TEF-1 (Chen y cols., 1994), un miembro de la familia del TGF- β (Zhou y cols., 1993). En otros casos (Greenberg y cols., 1994), el bajo número de transgénicos obtenido (1 de 100) lleva a sus autores a postular la hipótesis de que la sobreexpresión del transgén (Dp71, un producto no muscular del gen de la distrofia muscular de Duchenne) tenga efectos deletéreos para el desarrollo embrionario del ratón. El análisis que se está llevando a cabo sobre los ratones transgénicos en los que se ha interrumpido su período de gestación contribuirá a dilucidar el efecto deletéreo que postulamos en los ratones transgénicos portadores de los transgenes bK5-hK1 y bK6 β -hK1.

En el caso más concreto de las queratinas, existen ejemplos de transgenes de

queratinas que producen efectos deletéreos para el embrión: Albers y cols. (1995), dirigen la expresión de la queratina K14 al hígado de ratones transgénicos, y obtienen líneas en las que la cantidad de proteína detectada es baja (no logran visualizarla en geles de proteínas teñidos con azul de Coomassie) pero capaz de alterar la estructura y función hepática. Postulan la posibilidad de que niveles altos de proteína transgénica sean causantes de letalidad embrionaria pero no aportan más datos a favor de esta hipótesis. Se ha caracterizado la letalidad embrionaria causada por la inactivación del gen de la queratina K8: en estos ratones la sangre contiene proporciones anómalas de eritrocitos nucleados, y el análisis histológico del hígado muestra una actividad hematopoyética reducida, lo que sugiere una incapacidad por parte del hígado de asumir su función como órgano hematopoyético principal, una vez que el saco vitelino ha dejado de ejercer esta función (Baribault y cols., 1993).

Por otro lado, es interesante destacar la frecuencia con la que los transgenes portadores de la queratina hK1 (tanto los bK5-hK1 como los bK6 β -hK1) integran varias copias reordenadas o parcialmente delecionadas (figuras 7 y 20). Se han descrito secuencias de ADN que con frecuencia muestran inestabilidad en ratones transgénicos: loci con secuencias repetidas en tandem tales como minisatélites o repeticiones de trinucleótidos (Collick y cols., 1994). Sin embargo no se han descrito estas secuencias en el gen de hK1 (Johnson y cols., 1985) o en las secuencias reguladoras de las queratinas bovinas bK5 y bK6 β (Blessing y cols., 1987). Covarrubias y cols., (1986) encuentran en los reordenamientos del ADN la causa de la letalidad embrionaria en una línea de transgénicos con el gen de la hormona de crecimiento; este caso no sería comparable a lo obtenido en los transgénicos portadores de hK1, ya que se debe a una mutación insercional con reordenamientos de las secuencias flanqueantes. Es probable en el caso de los transgenes de hK1, que se vea favorecido el nacimiento de ratones portadores de copias reordenadas del transgén, ya que presumiblemente éstas copias no se transcriben de forma eficaz y no llegan a formar proteína transgénica; este argumento sería compatible con que la presencia del transgén tiene efectos deletéreos para el embrión.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto la gran sensibilidad de las células epiteliales a alteraciones en el programa normal de diferenciación terminal, hasta el punto de resultar en algunos casos, letal durante el período de vida embrionaria. La importancia fundamental de la expresión específica de los FI en la función de los tejidos se encuentra en estrecha correlación con la correcta expresión de queratinas y la diferenciación epidérmica.

CONCLUSIONES

1.- Se ha estudiado, mediante expresión ectópica en ratones transgénicos, la función de la queratinas epidérmicas K1 y K10. La expresión ectópica del gen de la queratina humana hK10 bajo el control de bK5 en ratones transgénicos conduce a la aparición de ratones con un fenotipo característico: tamaño pequeño, temblor fino, paresia en las extremidades posteriores y viabilidad reducida. El mismo gen bajo el control de bK6 β genera ratones también con un fenotipo particular, diferente al anterior, letal hacia el cuarto día de vida postnatal: tamaño pequeño, ausencia de contenido lácteo en el estómago, formación de leucoplasia lingual. Estos resultados demuestran que alteraciones en la expresión correcta y específica de las queratinas conducen a alteraciones fenotípicas y funcionales.

2.- La expresión de la queratina hK10 en capas basales conduce a la formación de piel atrófica, con ausencia de estrato granuloso e hiperqueratosis ortoqueratótica muy acusada y expresión correcta del resto de las queratinas. En otros epitelios estratificados, tales como estómago aglandular y esófago, se observa una queratinización anómala, con el desarrollo de un estrato lúcido prominente.

3.- En otros tipos de epitelios, las alteraciones más importantes observadas son hipertrofia de los acinos pancreáticos y, sobre todo, depleción de linfocitos en el timo, alteración que conduce a estados de inmunodepresión.

4.- Probablemente de una manera secundaria, estos animales también presentan alteraciones circulatorias, nerviosas, motoras y musculares.

5.- La queratina hK10 dirigida por bK6 β a células suprabasales conduce a la formación de leucoplasias orales, a la hiperplasia y degeneración de los epitelios donde se expresa (lengua, paladar, epitelio gingival), fenómenos que tienen como consecuencia la muerte en los primeros días de vida postnatal. Estas alteraciones son muy similares a las descritas en pacientes de paquioniquia congénita, causadas por mutaciones en las queratinas K6, K16 y K17.

6.- Se ha analizado el posible papel de la queratina K10 en el desarrollo tumoral aplicando protocolos de carcinogénesis química a las líneas de ratones transgénicos bK5-hK10 y bK6 β -hK10 portadoras de pocas copias del transgén. La expresión forzada de la queratina hK10 en el proceso de carcinogénesis es capaz de retrasar el momento de la formación de tumores malignos. Los ratones transgénicos portadores del gen de hK10 desarrollan carcinomas que expresan la proteína transgénica hK10, lo cual no parece tener influencia ni sobre el número ni el grado histológico de los tumores generados, pero sí sobre la cinética temporal con que estos aparecen.

7.- La expresión ectópica de los genes de las queratinas humanas hK1 y hK10 bajo el control de bK5 y bK6 β en ratones transgénicos tiene efectos deletéreos durante el desarrollo embrionario, resultando letales durante la embriogénesis.

8.- De todo lo anteriormente expuesto se deduce: a) que la queratina K10 juega un papel preponderante en la función y diferenciación epiteliales; b) que las queratinas no son intercambiables , sino que su patrón específico de expresión es necesario para el mantenimiento de la diversidad estructural y funcional de los epitelios.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Oshima, R.G. (1990). A single human keratin 18 gene is expressed in diverse epithelial cells of transgenic mice. *J. Cell. Biol.* 111:1197-1206.
- Achtstätter, T., Hatzfeld, M., Quinlan, R.A., Parmelee, D.C., Franke, W.W. (1986). Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoresis and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. *Methods Enzymol.* 134:355-371.
- Albers, K.M. y Fuchs, E. (1987). The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J. Cell Biol.* 105:791-896.
- Albers, K.M. y Fuchs, E. (1989). Expression of mutant keratin cDNAs in epithelial cells reveals possible mechanisms for initiation and assembly of intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 108:1477-1493.
- Albers, K.M., Davies, F.E., Perrone, T.E., Lee, E.Y., Liu, Y., Vore, M. (1995). Expression of an epidermal keratin protein in liver of transgenic mice causes structural and functional abnormalities. *J. Cell Biol.* 128:157-169.
- Aldaz, C.M., Trono, D., Larcher, F., Slaga, T.J., Conti, C.J. (1989). Sequential trisomization of chromosomes 6 and 7 in mouse skin premalignant lesions. *Mol. Carcinog.* 2:22-26.
- Anton-Lamprecht, I. (1994). Ultrastructural identification of basic abnormalities as clues to genetic disorders of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 103:6S-12S.
- Asselineau, D., Darmon, M. (1995). Retinoic acid provokes metaplasia of epithelium formed in vitro by adult human epidermis. *Differentiation* 58:297-306.
- Auewarakul, P., Gissman, L., Cid-Arregui, A. (1994). Targeted expression of the E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 16 in the epidermis of transgenic mice elicits generalized epidermal hyperplasia involving autocrine factors. *Moll. Cell. Biol.* 14:8250-8258.
- Bader, B.L., Franke, W.W. (1990). Cell type-specific and efficient synthesis of human cytokeratin 19 in transgenic mice. *Differentiation* 45:109-118.
- Bader, B.L., Magin, T.M., Freudenmann, M., Stump, S., Franke, W.W. (1991). Intermediate filaments formed de novo from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus. *J. Cell Biol.* 115:1293-1307.
- Bailleul, B., Surani, M.A., White, S., Barton, S.C., Brown, K., Blessing, M., Jorcano, J., Balmain, A. (1990). Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a *ras* oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 62:697-708.
- Bangrazi, C., Mouton, D., Neveu, T., Saran, A., Covelli, V., Doria, G., Biozzi, G. (1990). Genetics of chemical carcinogenesis. 1. Bidirectional selective breeding of susceptible and resistant lines of mice of two-stage skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11:1171-1179.
- Baribault, H., Oshima, R.G. (1991). Polarized and functional epithelia can form after the targeted inactivation of both mouse keratin 8 alleles. *J. Cell Biol.* 115:1675-1684.
- Baribault, H., Price, J., Miyai, K., Oshima, R.G. (1993). Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Gen. & Dev.* 7:1191-1202.
- Baribault, H., Penner, J., Iozzo, R.V., Wilson-Heiner, M. (1994). Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev.* 8:2964-2973.
- Behringer, R.R., Peschon, J.J., Messing, A., Gartside, C.L., Hauschka, S., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1988). Heart and bone tumors in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2648-2652.

- Bianchi, A.B., Aldaz, C.M., Conti, C.J. (1990). Non-random duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6902-6906.
- Bickenbach, J.R., Greer, J.M., Bundman, D.S., Rothnagel, J.A., Roop, D.R. (1995). Loricrin expression is coordinated with other epidermal proteins and the appearance of lipid lamellar granules in development. *J. Invest. Dermatol.* 104:405-410.
- Blessing, M., Zentgraf, H., Jorcano, J.L. (1987). Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences. *EMBO J.* 6:567-575.
- Blessing, M., Jorcano, J.L., Franke, W.W. (1989). Enhancer elements directing cell-type-specific expression of cytokeratin genes and changes of the epithelial cytoskeleton by transfection of hybrid cytokeratin genes. *EMBO J.* 8:117-126.
- Blessing, M., Rütther, U., Franke, W.W. (1993). Ectopic synthesis of epidermal cytokeratins in pancreatic islet cells of transgenic mice interferes with cytoskeletal order and insulin production. *J. Cell Biol.* 120:743-755.
- Bloom, W., Fawcett, D.W. (1981). Tratado de Histología. Ed. Labor. 8ª edición.
- Bonifas, J.M., Rothman, A.L., Epstein, E.H. (1991). Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254:1202-1205.
- Bowden, G.T., Schneider, B., Domann, R., Kulesz-Martin, M. (1994). Oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation during multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 54:1882s-1886s
- Bowden, P.E., Haley, J.L., Kinsky, A., Rothnagel, J.A., Jones, D.O., Turner, R.J. (1995). Mutation of a type II keratin gene (K6a) in pachyonychia congenita. *Nature Genetics* 10:363-365.
- Bremmer, R., Balmain, A. (1990). Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell* 61:407-417.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K., Palmiter, R.D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:4438-4442.
- Brisette, J.L., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Hall, J.E., Dotto, G.P. (1994). Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:6453-6457.
- Byrne, C., Fuchs, E. (1993). Probing keratinocyte and differentiation specificity of the human K5 promoter in vitro and in transgenic mice. *Moll. Cell. Biol.* 13:3176-3190.
- Byrne, C., Tainsky, M., Fuchs, E. (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120:2369-2383.
- Capetanaki, Y., Smith, S., Heath, J.P. (1989). Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J. Cell Biol.* 109:1653-1664.
- Casanova, Ll. (1994). Estudio de la regulación de la expresión y de la función de la queratina 8 humana de epitelios simples. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Casanova, Ll., Bravo, A., Were, F., Ramírez, A., Jorcano, J.L., Vidal, M. (1995) Tissue-specific and efficient expression of the human simple epithelial keratin gene in transgenic mice. *J. Cell Sci.* 108:811-820.
- Casatorres, J. (1993). Estudio del control de la expresión y especificidad de tejido del gen de la queratina bovina 5: papel fundamental de un elemento AP1. Tesis doctoral. Univ. Autónoma de Madrid.

- Casatorres, J., Navarro, M., Blessing, M., Jorcano, J.L. (1994). Analysis of the control of expression and tissue specific of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 269:20489-20496.
- Caulin, C., Scholl, F.G., Frontelo, P., Gamallo, C., Quintanilla, C. (1995). Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to Transforming Growth Factor- β_1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth & Differ.* 6:1027-1035.
- Colucci-Guyon, E., Portier, M.M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S., Babinet, C. (1994). Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 79:679-694.
- Collick, A., Norris, M.L., Allen, M.J., Bois, P., Barton, S.C., Surani, M.A., Jeffreys, A.J. (1994). Variable germline and embryonic instability of the human minisatellite MS32 (D1S8) in transgenic mice. *EMBO J.* 13:5745-5753.
- Collin, C., Moll, R., Kubicka, S., Franke W.W. (1992). Characterization of human cytokeratin-2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. *Exp. Cell Res.* 202:1-12.
- Côte, F., Collard, J.F., Julien, J.P. (1993). Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 73:35-46.
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Vassar, R., Fuchs, E. (1991a). A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases. *J. Cell Biol.* 115:1661-1674.
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A.S., Fuchs, E. (1991b). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: Genetic and functional analysis. *Cell* 66:1301-1311.
- Crick, F.H.C. (1953). The Fourier transform of a coiled-coil. *Acta Cryst.* 6:685-688.
- Copp, A.J. (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trend in Genet.* 11:87-93.
- Covarrubias, L., Nishida, Y., Mintz, B. (1986). Early postimplantation embryo lethality due to DNA rearrangements in a transgenic mouse strain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6020-6024.
- Cowin, P., Franke, W.W., Grund, C., Kapprell, H.P., Kartenbeck, J. (1985). The desmosome-intermediate filament complex. En: Edelman, G., Thiery, J.P. (eds.). *The cell in contact* pp. 427-460. New York Willey.
- Chan, Y., Anton-Lamprecht, I., Yu, Q.C., Jäckel, A., Zabel, B., Ernst, J.P., Fuchs, E. (1994). A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes & Dev.* 8:2574-2587.
- Chen, Z., Friedrich, G.A., Soriano, P. (1994). Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes & Dev.* 8:2293-2301.
- Cheng, C., Kilkenny, A.E., Roop, D., Yuspa, S.H. (1991). The v-ras oncogene inhibits the expression of differentiation markers and facilitates expression of cytokeratins 8 and 18 in mouse keratinocytes. *Mol. Carcinog.* 3:363-373.
- Cheng, J., Syder, A.J., Yu, Q.C., Letai, A., Paller, A.S., Fuchs, E. (1992). The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes. *Cell* 70:811-819.
- Chipev, C.C., Korge, B.P., Markova, N., Bale, S.J., DiGiovanna, J.J., Compton, J.G., Steinert, P.M. (1992). A leucine→proline mutation in the H1 subdomain of keratin 1 causes epidermolytic hyperkeratosis. *Cell* 70:821-828.

- Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chung, S.Y., Cheng, C.K., Rothnagel, J.A., Yu, S.H., Nakazawa, H., Mehrel, T., Hohl, D., Rosenthal, D.S., Steinert, P.M., Yuspa, S.H., Roop, D.R.** (1994). Expression of the human Keratin gene (K1) in transgenic mice is tissue-specific but altered with respect to differentiation state. *Moll. and Cell. Differentiation* 2:61-81.
- Dawson, C.W., Eliopoulos, A.G., Dawson, J., Young, L.S.** (1995). BHRF1, a viral homologue of the bcl-2 oncogene, disturbs epithelial cell differentiation. *Oncogene* 9:69-77.
- DiGiovanni, J.** (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol. Ther.* 54:63-128.
- Domenjoud, L., Jorcano, J.L., Breuer, B., Alonso, A.** (1988). Synthesis and fate of keratins 8 and 18 in non epithelial cells transfected with cDNA. *Exp. Cell Res.* 179:352-361.
- Dominey, A.M., Wang, X.J., King Jr., L.E., Nanney, L.B., Gagne, T.A., Sellheyer, K., Bundman, D.S., Longley, M.A., Rothnagel, J.A., Greenhalgh, D.A., Roop, D.R.** (1993). Targeted overexpression of transforming growth factor α in the epidermis of transgenic mice elicits hyperplasia, hyperkeratosis, and spontaneous, squamous papillomas. *Cell Growth & Differ.* 4:1071-1082.
- Drozdzoff, V., Wall, N.A., Pledger, W.J.** (1994). Expression and growth inhibitory effect of decapentaplegic Vg-related protein 6: Evidence for a regulatory role in keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:5528-5532.
- Dlugosz, A.A., Yuspa, S.H.** (1993). Coordinate changes in gene expression which mark spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.* 120:217-225.
- Eichner, R., Sun, T.T., Aebi, U.** (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 102:1767-1777.
- Farese R.V., Ruland, S.L., Flynn, L.M., Stokowski, R.P., Young, S.G.** (1995). Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:1774-1778.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Franke, W.W., Schiller, D.L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Kepler, R., Platzer, B.** (1981). Diversity of cytokeratins: differentiation-specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Moll. Biol.* 153:933-959.
- Franke, W.W., Schmid, E., Mitnacht, S., Grund, C., Jorcano J.L.** (1984). Integration of different keratins into the same filament system after microinjection of mRNA for epidermal keratins into kidney epithelial cells. *Cell* 36:813-825.
- Frisch, S.M., Francis, H.** (1994). Disruption of epithelial-cell matrix interaction induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124:619-626.
- Fuchs, E., Green, H.** (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19: 1033-1042.
- Fuchs, E.** (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* 111:2807-2814.
- Fuchs, E., Esteves, R.A., Coulombe, P.A.** (1992). Transgenic mice expressing a mutant keratin 10 gene reveal

the likely genetic basis for epidermolytic hyperkeratosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6906-6910.

Fuchs, E. (1994). Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *J. Cell Biol.* 125:511-516.

Fuchs, E., Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63:345-382.

Fuchs, E., Coulombe, P., Cheng, J., Chan, Y., Hutton, E., Syder, A., Degenstein, L., Yu, Q.C., Letai, A., Vassar, R. (1994). Genetic bases of epidermolysis bullosa simplex and epidermolytic hyperkeratosis. *J. Invest. Dermatol.* 103:25S-30S.

Gimenez-Conti, I.B., Bianchi, A.B., Fisher, S.M., Reiniers, J.J. Jr., Conti, C.J., Slaga, T.J. (1992). Dissociation of sensitivities to tumor promotion and progression in outbred and inbred SENCAR mice. *Cancer Res.* 52:3432-3435.

Giudice, G.J., Fuchs, E. (1987). The transfection of human epidermal keratin genes into fibroblasts and simple epithelial cells: evidence for inducing a type I keratin by a type II gene. *Cell* 48:453-463.

Glick, A.B., Kulkarni, A.B., Tennenbaum, T., Hennings, H., Flanders, K.C., O'Reilly, M., Sporn, M.B., Karlsson, S., Yuspa S.H. (1993). Loss of TGF- β expression in mouse epidermis and epidermal tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:6076-6080.

Gounari, F., Merdes, A., Quinlan, R., Hess, J., FitzGerald, P.G., Ouzounis, C.A., y Georgatos, S.D. (1993). Bovine filensin possesses primary and secondary structure similarity to intermediate filament proteins. *J. Cell Biol.* 121:847-853

Grace, M.P., Kim, K.H., True, L.D., Fuchs, E. (1985). Keratin expression in normal esophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Res.* 45:841-846.

Greenberg, D.S., Sunada, Y., Campbell, K.P., Yaffe, D., Nudel, U. (1994). Exogenous Dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in mdx mice. *Nature Genet.* 8:340-344.

Greenhalgh, D.A., Rothnagel, J.A., Quintanilla, M.J., Orengo, C.C., Gagne, T.A., Bundman, D.S., Longley, M.A., Roop, D.R. (1993 a). Induction of epidermal hyperplasia, hyperkeratosis and papillomas in transgenic mice by a targeted v-Ha-ras oncogene. *Mol. Carcinogenesis* 7:99-110.

Greenhalgh, D.A., Rothnagel, J.A., Wang, X.J., Quintanilla, M.J., Orengo, C.C., Gagne, T.A., Bundman, D.S., Longley, M.A., Fisher, C., Roop, D.R. (1993 b). Hyperplasia, hyperkeratosis and benign tumour production in transgenic mice by a targeted v-fos oncogene suggest a role for fos in epidermal differentiation and neoplasia. *Oncogene* 8:2145-2157.

Greenhalgh, D.A., Quintanilla, M.I., Orengo, C.C., Barber, J.L., Eckhardt, J.N., Rothnagel, J.A., Roop, D.R. (1993 c). Cooperation between v-fos and *ras*^{Ha} induces autonomous papillomas in transgenic epidermis but not malignant conversion. *Cancer Res.* 53:5071-5075.

Greenhalgh, D.A., Roop, D.R. (1994). Dissecting molecular carcinogenesis: development of transgenic mouse models by epidermal gene targeting. *Adv. Cancer Res.* 64:247-296.

Greenhalgh, D.A., Wang, X.J., Eckhardt, J.N., Roop, D.R. (1995). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate promotion of transgenic mice expressing epidermal-targeted v-fos induces *ras*^{Ha}-activated papillomas and carcinomas without p53 mutation: association of v-fos expression with promotion and tumor autonomy. *Cell Growth & Differ.* 6:579-586.

- Greenspan, D., Greenspan, J.S., Conant, M.A., Petersen, V., Silverman, S.Jr, De Souza, Y. (1984). Oral "hairy" leukoplakia in male homosexuals: evidence of association with both papillomavirus and a herpes-group virus. *Lancet* 2:831-834.
- Grosveld, F., Van Assendlft, G.B., Greaves, D.R., Kollias, G. (1987). Position-independent, high level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51:975-985.
- Guo, L., Yu, Q., Fuchs, E. (1993). Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits striking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *EMBO J.* 12: 3359-3372.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). Antibodies, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Heid, H.W., Werner E., y Franke W.W. (1986). The complement of native α -keratin polypeptides of hair forming cells: a subset of eight polypeptides that differ from epithelial cytokeratins. *Differentiation* 37:137-157.
- Heid, H., Moll, W., Franke, W.W. (1988). Patterns of expression of trichocytic and epithelial cytokeratins in mammalian tissues. II. concomitant and mutually exclusive synthesis of trichocytic and epithelial cytokeratins in diverse human and bovine tissues (hair follicle, nail bed and matrix, lingual papilla, thymic reticulum). *Differentiation* 37:215-230.
- Henikoff, S. (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* 6:422-426. BUSCAR
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C.K., Steinert, P., Holbrook, K., Yuspa, S.H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19: 245-254.
- Hennings, H., Shores, R., Mitchell, P., Spangler, E.F., Yuspa, S.H. (1985). Induction of papillomas with a high probability of conversion to malignancy. *Carcinogenesis* 6:1607-1610.
- Hennings, H., Glick, A.B., Lowry, D.T., Krasmanovic, L.S., Sly, L.M., Yuspa, S.H. (1993). FVB/N mice: a inbred strain sensitive to the chemical induction of the squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis* 14: 2353-2358.
- Hertle, M.D., Adams, J.C., Watt, F.M. (1991). Integrin expression during human epidermal development *in vivo* and *in vitro*. *Development* 112:193-206.
- Hockenberry, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-335.
- Hogan, B., Constatini, Lacey, E. (1986). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., Lacey, E. (1994). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.
- Huff, C.A., Yuspa, S.H., Rosenthal, D. (1993). Identification of control elements 3'to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. *J. Biol. Chem.* 268:377-384.
- Huitfeld, H.S., Heyden, A., Clausen, O.P.F., Thrane, E.V., Roop, D., Yuspa, S.H. (1991). Altered regulation of growth and expression of differentiation associated keratins in benign mouse skin tumors. *Carcinogenesis* 12:2063-2067.
- Imakado, S., Bickenbach, J.R., Bundman, D.S., Rothnagel, J.A., Attar, P.S., Wang, X.J., Walczak, V.R., Wisniewski, S., Pote, J., Gordon, J.S., Heyman, R.A., Evans, R.M., Roop, D.R. (1995). Targeting expression of a dominant-negative retinoic acid receptor mutant in the epidermis of transgenic mice results in

loss of barrier function. *Genes Dev.* 9:317-329.

Imamoto, A., Wang, X.J., Fujiki, H., Walker, S.E., Beltrán, L.M., DiGiovanni, J. (1993). Comparison of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and teleocidin for induction of epidermal hyperplasia, activation of epidermal PCC isozymes and skin tumor promotion in SENCAR and C57BL/6 mice. *Carcinogenesis* 14:719-724.

Ioffe, E., Stanley, P. (1994). Mice lacking N-acetylglucosaminyl-transferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:728-732.

Iversen, O.H. (1991). The skin tumorigenic and carcinogenic effects of different doses, numbers of dose fractions and concentrations of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in acetone applied on hairless mouse epidermis. Possible implications for human carcinogenesis. *Carcinogenesis* 12:493-502.

Jiang, C.K., Epstein, H.S., Tomic, M., Freedberg, I.M., Blumenberg, M. (1990). Epithelial-specific gene expression: identification of a 300 base-pair controlling segment. *Nucleic Acids Res.* 18:247-253.

Jiang, C.K., Magnaldo, T., Ohtsuki, M., Freedberg, I.M., Bernerd, F., Blumenberg, M. (1993). Epidermal growth factor and transforming growth factor α specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:6786-6790.

Johnson, L., Idler, W., Zhou, X.M., Roop, D., Steinert, P. (1985). Structure of a gene for the human epidermal 67-kda keratin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1896-1900.

Jorcano, J.L., Magin, T.M., Franke, W.W. (1984). Cell type-specific expression of bovine keratin genes as demonstrated by the use of complementary DNA clones. *J. Mol. Biol.* 176:21-37.

Jorcano, J.L., Franz, J.K., Franke, W.W. (1986). Amino acid sequence diversity between bovine epidermal cytokeratin polypeptides of the basic (type II) subfamily as determined from cDNA clones. *Differentiation* 28:155-163.

Kartasova, T., Roop, D.R., Holbrook, K., Yuspa, S.H. (1993). Mouse differentiation-specific keratins 1 and 10 require a preexisting keratin scaffold to form a filament network. *J Cell Biol.* 120:1251-1261.

Kemp, D.J., Donehower, L.A., Bradley, A., Balmain, A. (1993). Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression on chemically induced skin tumors. *Cell* 74:813-822.

Keough, R., Powell, B., Rogers, G. (1995). Targeted expression of SV40T antigen in the hair follicle of transgenic mice produces an aberrant hair phenotype. *J. Cell Sci.* 108:957-966.

Kimonis, V., DiGiovanna J.J., Yang, J.M., Doyle, S. Z., Bale, S.J. Compton, J.G. (1994). A mutation in the V1 end domain of keratin 1 in non-epidermolytic palmar-plantar keratoderma. *J. Invest. Dermatol.* 103:764-769.

Klein-Szanto A.J.P. (1989). Pathology of human and experimental skin tumors. En: C.J. Conti, T.J. Slaga y A.J.P. Klein-Szanto (eds). *Carcinogenesis*, Vol. 11. Skin Tumors. Experimental and Clinical Aspects, pp. 19-53. Raven Press. New York.

Klymkovsky, M.W., Shook, D.R., Maynell, L.A. (1992). Evidence that the deep keratin filament systems of the *Xenopus* embryo act to ensure normal gastrulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 8763-8740.

Korge, B.P., Compton, J.G., Steinert, P.M., Mischke, D. (1992 a). The two size alleles of human keratin 1 are due to a deletion in the glycine-rich carboxyl-terminal V2 subdomain. *J. Invest. Dermatol.* 99:697-702.

- Korge, B.P., Gan, S.Q., McBride, O.W., Mischke, D., Steinert, P.M. (1992 b). Extensive size polymorphism of the human keratin 10 chain resides in the carboxyl-terminal V2 subdomain due to variable numbers and sizes of glycine loops. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:910-914.
- Kremer, H., Zeeuwen, P., McLean, W.H.I., Mariman, E.C.M., Lane, E.B., van de Kerkhof, P.C.M., Ropers, H.H., Stejlen, P.M. (1994). Ichtyosis bullosa of Siemens is caused by mutations in the keratin 2e gene. *J. Invest. Dermatol.* 103:286-289.
- Kulesh, D. A. y Oshima, R.G. (1988). Cloning the human keratin 18 gene and its expression in non epithelial mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 8:1540-1550.
- Kulesz Martin M., Kilkenny, A.G., Holbrock, K.A., Digernes, V., Yuspa, S.H. (1983). Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium induced terminal differentiation. *Carcinogenesis* 4:1367-1377.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenish, R., Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19:4293.
- Laemli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambert, P. F., Pan, H., Pitot, H.C., Liem, A., Jackson, M., Griep, A.E. (1993). Epidermal cancer associated with expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes in the skin of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 5583-5587.
- Lane E.B., Alexander, C.M. (1990). Use of keratin antibodies in human diagnosis. *Seminars in Cancer Biology* 1:165-179.
- Lane, E.B., Rugg, E.L., Navsaria, H.A., Leigh, I.M., Heagerty, A.H.M., Ishida-Yamamoto, A., Eady, R.A.J. (1992). A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* 356:244-246.
- Langbein, L., Heid, H.W., Moll, I., Franke, W.W. (1993). Molecular characterization of the body site-specific human epidermal cytokeratin 9: cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue specificity of gene expression. *Differentiation* 55:57-71.
- Larcher, F., Bauluz, C., Diaz-Guerra, M., Quintanilla, M., Conti, C.J., Ballestín, C., Jorcano, J.L. (1992). Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol. Carcinog.* 6:112-121.
- Leask, A., Rosenberg, M., Vassar, R., Fuchs, E. (1990). Regulation of a human epidermal keratin gene: sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription. *Genes & Dev.* 4:1985-1988.
- Leask, A., Byrne, C., Fuchs, E. (1991). Transcription factor AP2 and its role in epidermal specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7948-7952.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., Mc Kay, R.D.G. (1990). CNS Stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595.
- Lehrach, H., Diamond, D., Worzney, J.M., Boedtke, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751.
- Lersch, R., Stellmach, V., Stocks, C., Giudice, G., Fuchs, E. (1989). Isolation, sequence and expression of a human keratin K5 gene: transcriptional regulation of keratins and insights of pairwise control. *Mol. Cell. Biol.* 9:3685-3697.

- Letai, A., Coulombe, P.A., McCormick, M.B., Yu, Q., Hutton, E., Fuchs, E.** (1993). Disease severity correlates with position of keratin point mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3197-3201.
- Leube, R.E., Bader, B.L., Bosch, F.X., Zimbelmann, R., Achtstaetter, T., Franke, W.W.** (1988). Molecular characterization and expression of the stratification-related cytokeratin 4 and 15. *J. Cell Biol.* 106:1249-1261.
- Lever, W.F., Schaumburg-Lever, G.** (1990). Tumores y quistes de la epidermis. En: *Histopatología de la piel*. pp. 493-541. Editorial Inter-Medica. 7ª edición.
- Lew, D., Brady, H., Klausning, K., Yaginuma, K., Theill, L.E., Stauber, C., Karin, M., Mellon, P.M.** (1993). GHF-1-promoter-targeted immortalization of a somatotropic progenitor cell results in dwarfism in transgenic mice. *Genes & Dev.* 7:683-693.
- Lichti, U., Yuspa, S.H.** (1988). Modulation of tissue and epidermal transglutaminase in mouse epidermal cells after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and/or retinoic acid *in vivo* and in culture. *Cancer Res.* 48:74-81.
- Lu, B., Rothnagel, J.A., Longley, M.A., Tsai, S.Y., Roop, D.R.** (1994). Differentiation-specific expression of human keratin 1 is mediated by a composite AP-1/steroid hormone element. *J. Biol. Chem.* 269:7443-7449.
- Lu, X., Lane, E.B.** (1990). Retrovirus-mediated transgenic keratin expression in cultured fibroblasts: specific domain functions in keratin stabilization and filament formation. *Cell* 62:681-696.
- Lloyd, C., Yu, Q.C., Cheng, J., Turksen, K., Degestein, L., Hutton, E., Fuchs, E.** (1995). The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. *J. Cell Biol.* 129:1329-1344.
- Mainiero, F., Pepe, A., Wary, K.K., Spinardi, L., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Giancotti, F.G.** (1995). Signal transduction by the $\alpha 6 \beta 4$ integrin: distinct $\beta 4$ subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J.* 14:4470-4481.
- Mansbridge, J.N. y Knapp, A.M.** (1987). Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 89:253-262.
- Markey, A.C., Lane, E.B., Churchill, L.J., MacDonald, D.M., Leigh, I.M.** (1991). Expression of simple epithelial keratins 8 and 18 in epidermal neoplasia. *J. Invest. Dermatol.* 97:763-770.
- Marthinuss, J., Lawrence, L., Seiberg, M.** (1995). Apoptosis in Pam212, an epidermal keratinocyte cell line: a possible role for bcl-2 in epidermal differentiation. *Cell Growth & Diff.* 6:239-250.
- Matrisian, L.M., Bowden, G.T., Krieg, P., Furstenberger, G., Briand, J.P., Leroy, P., Breathnach, R.** (1986). The mRNA coding for the secreted protease transin is expressed more abundantly in malignant than in benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9413-9417.
- Mc Call, C.A., Cohen, J.J.** (1991). Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous nuclease. *J. Invest. Dermatol.* 97:111-114.
- McLean, W.H.I., Rugg, E.L., Lunny, D.P., Morley, S.M., Lane, E.B., Swensson, O., Dopping-Hepenstal, P.J.C., Griffiths, W.A.D., Eady, R.A.J., Higgins, C., Navsaria, H.A., Leigh, I.M., Strachan, T., Kunkeler, L., Munro, C.S.** (1994). Ichtyosis bullosa of Siemens: a disease involving keratin 2e. *J. Invest. Dermatol.* 103: 277-281.
- McLean, W.H.I., Rugg, E.L., Lunny, D.P., Morley, S.M., Lane, E.B., Swensson, O., Dopping-**

- Hepenstal, P.J.C., Griffiths, W.A.D., Eady, R.A.J., Higgins, C., Navsaria, H.A., Leigh, I.M., Strachan, T., Kunkeler, R., Munro, C.S. (1995). Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nature Genetics* 9:273-278.
- McNab, A.R., Andrus, P., Wagner, T.E., Buhl, A.E., Waldon, D.J., Kawabe, T.T., Rea, T.J., Groppi, V., Vogelli, G. (1990). Hair-specific expression of chloramphenicol acetyltransferase in transgenic mice under the control of an ultra-high-sulphur keratin promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6848-6852.
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothangel, J.A., Longley, M.A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M.E., Steven, A.C., Steinert, P.M., Yuspa, S.H., Roop, D.R. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* 61:1103-1112.
- Menon, G.K., Grayson, S., Elias, P.M. (1985). Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.* 84:508-512.
- Miller, S.J., Wei, Z.G., Wilson, C., Dzubow, L., Sun, T.T., Lauker, R.M. (1993). Mouse skin is particularly susceptible to tumor initiation during early anagen of the hair cycle: possible involvement of hair follicle stem cells. *J. Invest. Dermatol.* 101:591-594.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24.
- Moll, R., Zimbelmann, R., Goldschmidt, M.D., Keith, M., Laufer, J., Kasper, M., Koch, P.J., Franke, W.W. (1993). The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 53:75-93.
- Morgenstern, J.P., Land, H. (1990). A series of mammalian expression vectors and characterization of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res.* 18:1068.
- Murillas, R., Larcher, F., Conti, C.J., Santos, M., Ullrich, A., Jorcano, J.L. (1995). Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *EMBO J.* 20: 5216-5223.
- Nagase, H., Bryson S., Cordell, H., Kemp, C.J., Fee, F., Balmain, A. (1995). Distinct genetic loci control development of benign and malignant skin tumours in mice. *Nature Genetics.* 10:424-429.
- Naito, M., Chenicek, K.J., Naito, Y., DiGiovanni, J. (1988). Susceptibility to phorbol ester skin tumor promotion in (C57BL/6 X DBA/2) F₁ mice is inherited as an incomplete dominant trait: evidence for multi-locus involvement. *Carcinogenesis* 9:639-645.
- Naito, M., DiGiovanni, J. (1989). Genetic Background and development of skin tumors. En: Conti, C.J., Slaga, T.J., Klein-Szanto, A.J.P. (ed). *Carcinogenesis*, vol. 3. *Skin tumors: experimental and clinical aspects*, pp.187-212. Raven Press, New York.
- Nassir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's Disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81:811-823.
- Navarro, J.M. (1992). La familia de genes de la queratina 6: carcterización y regulación. Tesis doctoral. Univ. Complutense de Madrid.
- Navarro, J.M., Casatorres, J., Jorcano, J.L. (1995). Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation associated keratin K6. *J. Biol. Chem.* 8:21362-21367.
- Navsaria, H.A., Swensson, O., Ratnavel, R.C., Shamsher, M., McLean, W.H.I., Lane, E.B., Griffiths,

- W.A.D., Eady, R.A.J., Leigh, I.M. (1995). Ultrastructural changes resulting from Keratin-9 gene mutations in two families with epidermolytic palmoplantar keratoderma. *J. Invest. Dermatol.* 104:425-429.
- Nelson, K.G., Slaga, T.J. (1982). Keratin modifications in epidermis, papillomas and carcinomas during two-stage carcinogenesis in the SENCAR mouse. *Cancer Res.* 42:4176-4181.
- Nelson, W. y Sun, T.T. (1983). The 50 and 58 k-dalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol.* 97:244-251.
- Neznanov N. S., Oshima, R.G. (1993). *cis* regulation of the keratin 18 gene in transgenic mice. *Moll. Cell. Biol* 13:1815-1823.
- Neznanov, M., Thorey, S., Ceceña, G., Oshima, R. (1993). Transcriptional insulation of the human keratin 18 gene in transgenic mice. *Moll. Cell. Biol* 13:2214-2223.
- Nischt, R., Roop, D.R., Mehrel, T., Yuspa, S.H., Rentrop, M., Winter, H., Schweizer, J. (1988). Aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis of a type I 47-kDa keratin, K13, normally associated with terminal differentiation of internal stratified epithelia. *Mol. Carcinog.* 1:96-108.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H. (1977). High resolution two dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
- Ohara, O., Gahara, Y., Miyake, T., Teraoka, H., Kitamura, T. (1993). Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J. Cell Biol.* 121:387-395.
- Oshima, R.G., Howe, W.F., Klier, F.G., Adamson, E.D., Shevinsky, L.H. (1983). Intermediate filament protein synthesis in preimplantation murine embryos. *Dev. Biol.* 99:447-455.
- Oshima, R.G., Trevor, K., Shevinsky, L.H., Ryder, O.A., Ceceña, G. (1988). Identification of the gene coding for the Endo B murine cytokeratin and its methylated, stable inactive state in mouse nonepithelial cells. *Genes & Dev.* 2:505-516.
- Oshima, R.G., Abrams, L., Kulesh, D. (1990). Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of *c-fos* and *c-jun* in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes & Dev.* 2:505-516.
- Oshima, R.G. (1992). Intermediate filament molecular biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:110-116.
- Ostrowski, L.E., Finch, J., Krieg, P., Matrisian, L., Patskan, G., O'Connell, J.R., Phillips, J., Slaga, T.J., Breachnach, R., Bowden, G.T. (1988). Expression pattern of a gene for a secreted metalloproteinase during late stages of tumor progression. *Mol Carcinog.* 1:13-19.
- Ouellet, T., Lussier, M., Babaï, F., Lapointe, L., Royal, A. (1990). Differential expression of the epidermal K1 and K10 keratin genes during mouse embryo development. *Biochem. Cell Biol.* 68:448-453.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1986). Germ-line transformation of mice. *Annu. Rev. Genet.* 20:465-499.
- Paramio, J.M., Jorcano, J.L. (1994). Assembly dynamics of epidermal keratins K1 and K10 in transfected cells. *Exp. Cell Res.* 215:319-331.
- Paulin-Levasseur, M., Scherbath, A., Traub, U., Traub, P. (1988). Lack of lamins A and C in mammalian hemopoietic cell lines devoid of intermediate filament proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 47:121-131.
- Pekny, M., Levéen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C.H., Westermarck, B., Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate but develop and reproduce normally. *EMBO J.* 14:1590-1598.

- Pelling, J.C., Ernst, S.M., Strawhecker, J.M., Johnson, J.A., Nairn, R.S., Slaga, T.J. (1986). Elevated expression of Ha-ras is an early event in two-stage skin carcinogenesis in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 7:1599-1602.
- Poirier, J. (1978). *Histología humana*. Ed. Marban. 3ª edición.
- Poumay, Y., Pittelkow, M.R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.* 104:271-276.
- Powell, B.C., Rogers, G.E. (1990). Cyclic hair-loss and regrowth in transgenic mice overexpressing an intermediate filament gene. *EMBO J.* 9:1485-1493.
- Powell, B., Crocker, L., Rogers, G. (1992). Hair follicle differentiation: expression, structure and evolutionary conservation of the hair type II keratin intermediate filament gene family. *Development* 114:417-433.
- Punnonen, K., Denning, M., Lee, E., Li, L., Rhee, S.J., Yuspa, S.H. (1993). Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. *J. Invest. Dermatol.* 101:719-726.
- Quinlan, R.A., Schiller, D.L., Hatzfeld, M., Achtstätter, T., Moll, R., Jorcano, J.L., Magin, T.M., Franke, W.W. (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin Intermediate Filaments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455:282-306.
- Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., Balmain, A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322:78-80.
- Ramírez, A. (1993). Elementos reguladores en *cis* de la expresión génica de las queratinas 5 y 6; análisis en ratones transgénicos. Tesis doctoral. Univ. Complutense de Madrid.
- Ramírez, A., Bravo, A., Jorcano, J.L., Vidal, M. (1994). Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue-and cell-type-specific expression of a *lacZ* gene in the adult and during development. *Differentiation* 58:53-64.
- Ramírez, A., Vidal, M., Bravo, A., Larcher, F., Jorcano, J.L. (1995). A 5'-upstream region of a bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:4783-4787.
- Regnier, M., Darmon, M. (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates specifically the last steps of epidermal differentiation of cultured human keratinocytes. *Differentiation* 47:173-188.
- Reis, A., Hennies, H.C., Langbein, L., Digweed, M., Mischke, D. (1994). Keratin 9 gene mutations in epidermolytic palmoplantar keratoderma (EPPK). *Nature Genetics* 6: 174-179.
- Rentrop, M., Knapp, B., Winter, H., Schweizer, J. (1986). Differential localization of distinct keratin mRNA-species in mouse tongue epithelium by in situ hybridization with specific cDNA probes. *J. Cell Biol.* 106:2583-2591.
- Rice, R.H., Green, H. (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* 11:417-422.
- Rieger, M., Franke, W.W. (1988). Identification of an orthologous mammalian cytokeratin gene. *J. Mol. Biol.* 204:841-856.
- Rogers, G.E., Powell, B.C. (1993). Organization and expression of hair follicle genes. *J. Invest. Dermatol.* 101:50S-55S.

- Romano, V., Bosco, P., Rocchi, M., Cosat, G., Leube, R., Franke W.W., Romeo, G. (1988). Chromosomal assignments of human type I and type II cytokeratin genes to different chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 48:148-151.
- Roop, D.R., Huitfeldt, H., Kilkenny A., Yuspa S.H. (1987). Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured epidermal cells detected by monospecific antibodies to unique peptides of mouse epidermal keratins. *Differentiation* 35:143-150
- Roop, D.R., Krieg, T.M., Mehrel, T., Cheng, C.K., Yuspa, S.H. (1988). Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 48:3245-3252.
- Roop, D.R., Chung, S., Cheng, C.K., Steinert, P.M., Sinha, R., Yuspa, S.H., Rosenthal, D.S. (1989). Epidermal differentiation and its modulation by retinoids. En: Shroot, B., Schaefer, H., Valbonne (eds). *Pharmacology and the skin*, vol. 3, pp 1-7. Basel Karger.
- Roop, D.R., Mehrel, T., Krieg, T.M., Nakazawa, H., Cheng, C.K., Yuspa, S.H. (1989). Keratin expression in mouse epidermal tumors. En: Conti, C.J., Slaga, T.J., Klein-Szanto, A.J.P. (eds). *Carcinogenesis*, vol. 3. Skin tumors: experimental and clinical aspects, pp. 257-273. Raven Press, New York.
- Rosenberg, M., Ray-Chaudhury, A., Shows, T.B., Le Beau, M.M., Fuchs, E. (1988). A group of type I keratin genes on human chromosome 17: characterization and expression. *Mol. Cell. Biol.* 8:722-736.
- Rosenthal, D.S., Steinert, P.M., Chung, S., Huff, C.A., Johnson, J., Yuspa, S., Roop, D.R. (1991). A human epidermal differentiation-specific keratin gene is regulated by calcium but not negative modulators of differentiation in transgenic mouse keratinocytes. *Cell Growth & Diff.* 2:107-113.
- Rothnagel, J.A., Dominey, A.M., Dempsey, L.D., Longley, M.A., Greenhalgh, D.A., Gagne, T.A., Huber, M., Frenk, E., Holh, D., Roop, D.R. (1992). Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis. *Science* 257:1128-1130.
- Rothnagel, J.A., Greenhalgh, D.A., Gagne, T., Longley, M.A., Roop, D.R. (1993). Identification of a calcium-inducible epidermal-specific regulatory element in the 3'-flanking region of the human keratin 1 gene. *J. Invest. Dermatol.* 101:506-513.
- Rothnagel, J.A., Traupe, H., Wojcik, S., Huber, M., Hohl, D., Pittelkow, M.R., Saeki, H., Ishibashi, Y., Roop, D.R. (1994). Mutations in the rod domain of keratin 2e in patients with ichthyosis bullosa of Siemens. *Nature Genetics* 7:485-490.
- Rothnagel, J.A., Wojcik, S., Liefer, K.M., Dominey, A.M., Huber, M., Holh, D., Roop, D.R. (1995). Mutations in the 1A domain of Keratin 9 in patients with epidermolytic plantar keratoderma. *J. Invest. Dermatol.* 104:430-433.
- Ruggeri, R., Caamona, J., Goodrow, M., DiRado, M., Bianchi, A., Trona, D., Conti, C.J., Klein-Szanto A.J.P. (1991). Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res.* 51:6615-6621.
- Rugg, E.L., McLean, W.H.I., Lane, E.B., Pitera, R., McMillan, J.R., Dopping-Hepenstal, P.J.C., Navsaria, H.A., Leigh, I.M., Eady, R.A.J. (1994). A functional "knock out" of human keratin 14. *Genes & Dev.* 8:2563-2573.
- Rugh, R. (1990). The mouse. Its reproduction and development. Ed. Oxford University Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.

- Savtchenko, E.S., Tomic, M., Ivker, R., Blumenberg, M. (1990). Three parallel linkage groups of human acidic keratin genes. *Genomics* 7:394-407.
- Schermer, A., Galvin, S., Sun, T.T. (1986). Differentiation-related expression of a major 64 KDa corneal keratinocytes *in vivo* and in culture suggest limbal location of corneal epithelial "stem" cells. *J. Cell Biol.* 103:49-62.
- Schermer, A., Jester, J.V., Hardy, C., Milano, D., Sun, T.T. (1989). Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocyte differentiation. *Differentiation* 42:103-110.
- Schmid, E., Dorothea, L., Schiller, L., Grund, C., Stadler, J., Franke, W.W. (1983). Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland. *J. Cell Biol.* 96:37-50.
- Schweizer, J., Winter, H. (1982). Changes in regional keratin polypeptide patterns during phorbol ester-mediated reversible and permanently sustained hyperplasia of mouse epidermis. *Cancer Res.* 42:1517-1519.
- Schweizer, J., Fürstenberg, G., Winter, H. (1987). Selective suppression of two postnatally acquired 70 KD and 65 KD keratin proteins during continuous treatment of adult mouse tail epidermis with vitamin A. *J. Invest. Dermatol.* 89: 125-131.
- Schweizer, J., Rentrop, M., Nischt, R., Kinjo, M., Winter, H. (1988). The intermediate filament system of the keratinizing mouse forestomach epithelium: Coexpression of keratins of internal squamous epithelia and of epidermal keratins in differentiating cells. *Cell. Tissue Res.* 253:221-229.
- Schweizer, J., Baust, I., Winter, H. (1989). Identification of murine type I Keratin 9 (73 KDa) and its immunolocalization in neonatal and adult foot sole epidermis. *Exp. Cell Res.* 184:193-206.
- Schweizer, J. (1992). Mouse epidermal keratins. En: Darmon, M., Blumenberg, M. (ed). *Biology of skin*, pp.46-56. Academic Press, New York.
- Sellheyer, K., Bickenbach, J.R., Rothnagel, J.A., Bundman, D.S., Longley, M.A., Krieg, T., Roche, N.S., Roberts, A.S., Roop, D.R. (1993). Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor β_1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5237-5241.
- Slaga, T.J. (1989). Cellular and molecular mechanisms involved in multistage skin carcinogenesis. En: Conti, C.J., Slaga, T.J., Klein-Szanto, A.J.P. (ed). *Carcinogenesis*, vol. 3. Skin tumors: experimental and clinical aspects, pp. 1-19. Raven Press, New York.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Stark, H.J., Breitkreutz, D., Limat, A., Bowden, P., Fusening, N.E. (1987). Keratins of the human hair follicle. "Hyperproliferative" keratins consistently expressed in outer root sheath cells *in vivo* and *in vitro*. *Differentiation* 35:236-248.
- Steinert, P.M., Idler, W.W., Zimmerman, S.B. (1976). Self assembly of bovine keratin filaments *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 108:547-567.
- Steinert, P.M., Parry, D.A.D., Idler, W.W., Johnson, L.D., Steven, A.C., Roop, D.R. (1985). Amino acid sequence of mouse and human epidermal type II keratin of 67.000 molecular weight provide a systematic basis for the structure and functional diversity of the end domains of keratin intermediate filament subunits. *J. Biol. Chem.* 260:7142-7149.

- Steinert, P.M. (1988). The dynamic phosphorylation of the human intermediate filament keratin 1 chain. *J. Biol. Chem.* 263:13333-13339.
- Steinert, P.M., Roop, D.R. (1988). The molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57:593-625.
- Steinert, P.M., Liem, R.K.H. (1990). Intermediate filament dynamics. *Cell* 60: 521-523.
- Steinert, P.M. (1993). Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* 100:729-734.
- Steinert, P.M., Bale, S.J. (1993). Genetic skin diseases caused by mutations in keratin intermediate filaments. *Trends Genet.* 9:280-284.
- Steinert, P.M., North, A.C.T., Parry, D.A.D. (1994). Structural features of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* 103:19S-24S.
- Stellmach, V., Fuchs, E. (1989). Exploring the mechanisms underlying cell type-specific and retinoid mediated expression of keratins. *New Biologist* 1,305-317.
- Stellmach, V., Leask, A., Fuchs, E. (1991). Retinoid-mediated transcriptional regulation of keratin genes in human epidermal and squamous cell carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 4582-4586.
- Stenn, K.S., Goldenhersh, M.A., Trepeta, R.W. (1992). Structure and functions of the skin. En: Symmers, W.St.C.; Weedon, D. (eds.). *The skin* pp.1-14. Churchill Livingstone.
- Steven, A.C., Bisher, M.E., Roop, D.R., Steinert, P.M. (1990). Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin -two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol.* 104:150-162.
- Sun, T.T., Eichner, R., Schermer, A., Cooper, D., Nelson, W.G., Weiis, R.A. (1984). Classification, expression and possible mechanism of evolution of mammalian epithelial keratins: an unifying model. En: *Cancer cells 1. The transformed phenotype.* pp 169-176. Cold Spring Harbor Laboratory, Cols Spring Harbor, New York.
- Sundberg, J.P., Erickson, A. A., Roop, D.R., Binder, R.L. (1994). Ornithine decarboxylase expression in Cutaneous papillomas in SENCAR mice is associated with altered expression of keratins 1 and 10. *Cancer Res.* 54:1344-1351.
- Takahashi, K., Folmer, J., Coulombe, P.A. (1994). Increased expression of keratin 16 causes anomalies in cytoarchitecture and keratinization in transgenic mouse skin. *J. Cell Biol.* 127:505-520.
- Takemoto, Y., Fujimura, Y., Matsumoto, M., Morita, T., Matsushiro, A., Nozaki, M. (1991). The promoter of the endo A cytokeratin gene is activated by a 3'downstream enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19:2761-2765.
- Tennenbaum, T., Yuspa, S.H., Grover, A., Castronovo, V., Sobel, M.E., Yamada, Y., De Luca, L.M. (1992). Extracellular matrix receptors and mouse skin carcinogenesis altered expression linked to appearance of early markers of tumor progression. *Cancer Res.* 52:2966-2976.
- Tennenbaum, T., Weiner, A.K., Belanger, A.J., Glick, A.B., Hennings, H., Yuspa, S. H. (1993). The suprabasal expression of $\alpha 6 \beta 4$ integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 53:4803-4810.
- Torchard, D., Blanchet-Bardon, C., Serova, O., Langhein, L., Narod, S., Janin, N., Goguel, A.F.,

- Berheim, A., Franke, W.W., Lenoir, G.M., Feunteun, J. (1994). Epidermolytic palmoplantar keratoderma cosegregates with a keratin 9 mutation in a pedigree with breast and ovarian cancer. *Nature Genet.* 6:106-109.
- Torpey, N., Wylie, C.C., Heasman, J. (1992). Function of maternal cytokeratin in *Xenopus* development. *Nature* 357:188-193.
- Troyanovsky, S.M., Leube, R.E., Franke, W.W. (1992). Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern. *Eur. J. Cell Biol.* 59:127-137.
- Tu, P.H., Elder, G., Lazzarini, R., Nelson, D., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y. (1995). Overexpression of the human NFM subunit in transgenic mice modifies the level of endogenous NFL and the phosphorylation state of NFH subunits. *J. Cell Biol.* 129:1629-1640.
- Tyner, A. L., Fuchs, E. (1986). Evidence for post-transcriptional regulation of the keratins expressed during hyperproliferation and malignant transformation in human epidermis. *J. Cell Biol.* 103:1945-1955.
- Van Muijen, G.N.P., Ruiter, D.J., Franke, W.W. (1986). Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins n° 4 and 13. *Exp. Cell Res.* 162:97-113.
- Vassar, R., Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A., Fuchs, E. (1989). Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1563-1567.
- Vassar, R., Coulombe, P.A., Degenstein, L., Albers, K., Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64:365-380.
- Vassar, R., Fuchs, E. (1991). Transgenic mice provide new insights into the role of TGF α during epidermal development and differentiation. *Genes Dev.* 5:714-727.
- Waasem, A., Alexander, C.M., Steel, J.B., Lane, E.B. (1990 a). Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *New Biologist* 2:464-478.
- Waasem, A., Gough, A.C., Spurr, N.K., Lane, E.B. (1990 b). Localization of the gene for human simple epithelial keratin 18 to chromosome 12 using polymerase chain reaction. *Genomics* 7:188-194.
- Wang, X.J., Greenhalgh, D.A., Lu, X.R., Bickenbach, J.R., Roop, D.R. (1995). TGF α and v-fos cooperation in transgenic mouse epidermis induces aberrant keratinocyte differentiation and stable, autonomous papillomas. *Oncogene* 10:279-289.
- Weiss, R.A., Eichner, R.A., Sun, T.T. (1984). Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48 and 56 Kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J. Cell Biol.* 98:1397-1406.
- Whitelaw, C.B.A., Springbett, A.J., Webster, J., Clark, J. (1993). The majority of G₀ transgenic mice are derived from mosaic embryos. *Transgenic Res.* 2:29-32.
- Wilkie, T.M., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1986). Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Develop Biol.* 118:9-18.
- Wilson J.B., Weinberg, W., Johnson, R., Yuspa, S., Levine, A.J. (1990). Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* 61:1315-1327.
- Winter, H., Schweizer, J., Goerttler, K. (1980). Keratins as marker of malignancies in mouse epidermal tumors. *Carcinogenesis* 1:391-398.

- Wong, P.C., Marszalek, J., Crawford, T.O., Xu, Z., Hsieh, S.T., Griffin, J.W., Cleveland, D. (1995). Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. *J. Cell Biol.* 130:1413-1422.
- Wu, R.L., Galvin, S., Wu, S.K., Xu, C., Blumenberg, M., Sun, T.T. (1993). A 300 bp 5'-upstream sequence of a differentiation-dependent rabbit K3 keratin gene can serve as a keratinocyte-specific promoter. *J. Cell Sci.* 105:303-316.
- Wu, R.L., Guong, Z., Godvin, S., Xu, C., Haseba, T., Chaloin-Dufau, C., Dhouailly, D., Wei, Z.G., Lavker, R.M., Kao, W.Y., Sun, T.T. (1994). Lineage-specific and differentiation dependent expression of K12 keratin in rabbit corneal/limbal epithelial cells: cDNA cloning and northern blot analysis. *Differentiation* 55:137-144.
- Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., Cleveland, D.W. (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73:23-33.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Yoshikawa, K., Katagata, Y., Kondo, S. (1995). Relative amounts of Keratin 17 are higher than those of keratin 16 in hair-follicle-derived tumors in comparison with nonfollicular epithelial skin tumors. *J. Invest. Dermatol.* 104:396-400.
- Young, L.S., Lau, R., Rowe, M., Niedobitek, G., Packham, G., Shanahan, F., Rowe, D.T., Greenspan, D., Greenspan, J.S., Rickinson, A.B., Farrell, P.J. (1991). Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr Virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* 65:2868-2874.
- Yuspa, S.H., Kilkenny, A.E., Steinert, P.M., Roop, D.R. (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*. *J. Cell Biol.* 109:1207-1217.
- Yuspa, S.H., y Dlugosz, A.A. (1991). Cutaneous carcinogenesis: natural and experimental. En: L.A. Goldsmith (ed). Physiology Biochemistry and Molecular Biology of the Skin, pp. 1365-1402. Oxford University Press. New York.
- Yuspa, S.H. (1994). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis-Thirty third G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 54:1178-1189.
- Zhou, X.M., Idler, W.W., Steven, A.C., Roop, D.R., Steinert, P.M. (1988). The sequence and structure of human keratin 10: organization and possible structures of end domain sequences. *J. Biol. Chem.* 263:15584-15589.
- Zhou, X., Jasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.C., Kuehn, M.R. (1993). Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361:543-547.